



AI

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 27 724 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
G 02 B 21/00
G 02 B 23/24
G 02 B 6/26
A 61 B 1/07
A 61 B 1/04
H 01 S 3/16
H 01 S 3/10

⑳ Aktenzeichen: 199 27 724.9
㉔ Anmeldetag: 17. 6. 1999
㉕ Offenlegungstag: 20. 1. 2000

DE 199 27 724 A 1

③0 Unionspriorität:
4254/98 19. 06. 1998 AU
5207/98 12. 08. 1998 AU
7160/98 17. 11. 1998 AU

㉑ Anmelder:
Optiscan Pty Ltd., Notting Hill, AU

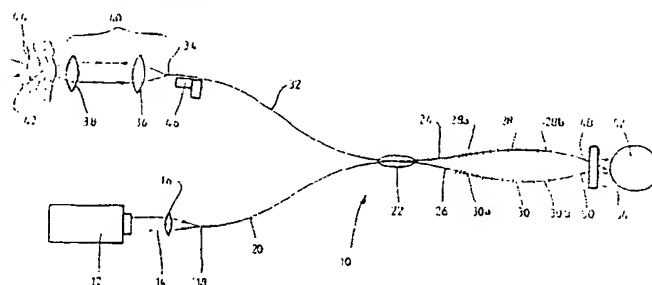
㉒ Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

㉓ Erfinder:
Harris, Martin Russel, Windsor, AU; Rosman,
Gavan Edmund, Camberwell, AU

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Verfahren und Vorrichtung mit Zweiphotonen-Endoskop oder Mikroskop

⑤7 Die Erfindung stellt ein Endoskop oder Mikroskop (10) bereit, das aufweist: eine optische Faser (20) zum Übertragen eines gepulsten Hauptstrahls über mindestens einen Abschnitt eines optischen Wegs zwischen einer Strahlquelle (12) und einem Gewebe (44) oder einer anderen Probe und eine Dispergiereinrichtung (28, 30), wobei in der optischen Faser auftretende Dispersion durch Dispersion umgekehrt wird, die durch die Dispergiereinrichtung erzeugt wird. Weiterhin stellt die Erfindung ein Endoskop oder Mikroskop (10) mit einem Kopf (40) bereit, wobei das Endoskop oder Mikroskop aufweist: eine Saug- oder Unterdruckquelle, die nahe dem Kopf angeordnet ist, eine Lichtauffangeinrichtung zum Auffangen von Licht von einer Probe und eine Probenaufnahmeeinrichtung, die mit der Saugquelle gekoppelt ist, zum Aufnehmen der Probe, wenn die Probe durch die Saugquelle daran gedrückt wird, wobei die Saugquelle verwendet wird, um die Probe zur Aufnahmeeinrichtung zu drücken, wodurch die Probe so verformt wird, daß die Lichtauffangeinrichtung einen Teil des durch die Probe vom Kopf weg emittierten Lichts auffangen kann.



DE 199 27 724 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft das Gebiet der Endoskopie und Mikroskopie, u. a. der Endomikroskopie, und insbesondere der Endoskopie und Mikroskopie (u. a. Endomikroskopie) mit Lichtwellenleitern bzw. optischen Fasern.

Wird im folgenden von Mikroskopen gesprochen, sollte verständlich sein, daß sich dies auch auf Endoskope bezieht.

In letzter Zeit entwickelte Ti : Saphir-Laser mit ultrakurzen Impulsen können extrem hohe optische Spitzenleistungen am Brennpunkt einer Linse mit hoher NA erzeugen, wodurch sich nichtlineare optische Effekte mit hohem Wirkungsgrad erzeugen lassen. Festgestellt wurde, daß Techniken mit Zweiphotonen-Abtastpunktanregung Vorteile für den Einsatz in herkömmlichen Tischmikroskopen haben.

Obwohl die klinische Nutzung der Zweiphotonenanregung potentiell die Fähigkeit bieten könnte, Bilder aus größerer Tiefe unter der Oberfläche eines Gewebes, reduzierte Photoausbleichung und das Vermögen zum Anregen von UV-Farbstoffen und Indikatoren ohne Einsatz von unzuverlässigen UV-Lasern und Speziallinsen zu erhalten, war bisher nicht klar, wie die Zweiphotonenanregung im Bereich der klinischen Endomikroskopie sinnvoll realisiert werden könnte. Zum Beispiel sind die hohen Kosten des KurzimpulsLasers ein Hauptnachteil für einen breiteren Einsatz der Zweiphotonen-Abtastpunkt-mikroskopie.

Kritischer im Hinblick auf die Erfindung ist, daß der Gebrauch einer optischen Faser zum Liefern des Laserlichts (wie bei früheren Endomikroskop-Konstruktionen) den Impuls dehnt, was die Spitzenintensität erheblich verringert. Dadurch reduziert sich der Wirkungsgrad der nichtlinearen Wechselwirkung, was die Signalstärke senkt. Eine Impulsverbreiterung in einer Faser im linearen Bereich kommt durch chromatische zeitliche Dispersion zustande, deren Grad sich anhand der Fourier-Transformierten der Impulsenhüllenden oder anhand der Heisenbergschen Unschärferelation voraussagen läßt. Beim Impulsdurchgang durch die Faser bewegt sich das blaue Ende der Fourier-Transformierten langsamer als das rote, und ein breiter Chirpimpuls tritt aus der Faser aus.

Somit schließen offenbar allein schon diese beiden Faktoren jede Berücksichtigung des Zweiphotonen-Endoskops als klinisches Diagnoseinstrument aus.

Daher besteht eine Aufgabe der Erfindung darin, ein verbessertes Endoskop, Mikroskop oder Endomikroskop unter Einsatz der Zweiphotonenanregung eines Gewebes bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird mit dem Gegenstand gemäß den Ansprüchen gelöst.

Somit stellt die Erfindung ein Endoskop oder Mikroskop bereit, das aufweist:

eine optische Faser zum Übertragen eines gepulsten Hauptstrahls über mindestens einen Abschnitt eines optischen Wegs zwischen einer Strahlquelle und einem Gewebe oder einer anderen Probe; und

eine Dispersiereinrichtung; wodurch in der optischen Faser auftretende Dispersion durch Dispersion umgekehrt wird, die durch die Dispersiereinrichtung erzeugt wird.

Vorzugsweise verfügt die Dispersiereinrichtung über eine optisch nach der optischen Faser angeordnete Kompressionseinrichtung zum Komprimieren des Strahls, nachdem der Strahl die optische Faser verläßt, um die Spitzenleistung des Hauptstrahls innerhalb der optischen Faser zu reduzieren.

Die Dispersiereinrichtung kann optisch vor oder nach der optischen Faser angeordnet sein und kann selbst eine weitere optische Faser aufweisen.

Vorzugsweise verfügt das Endoskop oder Mikroskop ferner über eine optisch vor der optischen Faser angeordnete Dispersionseinrichtung zum Dispergieren des Hauptstrahls, bevor der Hauptstrahl in die optische Faser eintritt.

Die Dispersionseinrichtung und/oder die Kompressionseinrichtung weisen jeweils vorzugsweise einen Glasblock, ein Gitter oder ein Prisma auf.

Vorzugsweise weisen die Dispersionseinrichtung und/oder die Kompressionseinrichtung hochdispergierendes Glas auf.

Vorzugsweise hat die optische Faser einen Kern mit großem Durchmesser und somit niedriger normierter Frequenz bzw. V-number, um die Flächenleistungsdichte im Kern zu reduzieren.

Die optische Faser kann einen reinen Siliziumdioxidkern und einen fluoriddotierten Mantel haben, um nichtlineare optische Effekte innerhalb der Faser zu minimieren.

Außerdem stellt die Erfindung ein Verfahren zur Zweiphotonen-Endoskopie oder Mikroskopie mit den folgenden Schritten bereit:

Übertragen eines gepulsten Hauptlaserstrahls längs einer optischen Faser über mindestens einen Abschnitt eines optischen Wegs zwischen einer Strahlquelle und einem Gewebe oder einer anderen Probe; und

Dispergieren des Strahls mittels einer Dispersiereinrichtung;

wodurch in der optischen Faser auftretende Dispersion durch Dispersion umgekehrt wird, die durch die Dispersiereinrichtung erzeugt wird.

In einem besonderen Aspekt der Erfindung wird ein Endoskop oder Mikroskop bereitgestellt, das aufweist:

eine Strahlteilereinrichtung zum Teilen eines gepulsten Hauptlaserstrahls in einen ersten und zweiten Strahl;

eine erste optische Faser zum Übertragen des Hauptstrahls zur Strahlteilereinrichtung;

eine Antidispersionseinrichtung zum Reduzieren der Dispersion des ersten und zweiten Strahls;

eine optische Kopplereinrichtung zum Rekombinieren mindestens eines Abschnitts des jeweiligen ersten und zweiten Strahls zu einem rekombinierten Strahl; und

eine zweite optische Faser zum Übertragen des rekombinierten Strahls von der optischen Kopplereinrichtung zu einem Endoskop- oder Mikroskopkopf;

wobei der Hauptstrahl durch die Strahlteilereinrichtung in den ersten und zweiten Strahl geteilt werden kann, deren Dispersion anschließend durch die Antidispersionseinrichtung reduziert werden kann und die dann durch die optische Kopplereinrichtung rekombiniert werden können, um einen rekombinierten Zweiphotonenstrahl zur Übertragung längs der zweiten optischen Faser zum Kopf zu bilden.

Dadurch kann ein gepulster Laserstrahl in einen Zweiphotonenstrahl zur Verwendung in einem Endoskop oder Mikroskop umgewandelt werden. Die Antidispersionseinrichtung reduziert die Dispersion oder komprimiert den ersten und zweiten Strahl. Verständlich sollte sein, daß die Kompression außerhalb der Antidispersionseinrichtung oder auch im Endoskop- oder Mikroskopkopf oder sogar in einer Gewebeprobe auftreten oder abgeschlossen werden kann.

Vorzugsweise weist das Endoskop oder Mikroskop eine Laserquelle auf, um den Hauptstrahl bereitzustellen.

Vorzugsweise ist die Laserquelle ein Ultrakurzimpuls-Laser und stärker bevorzugt ein Femtosekundenlaser.

Vorzugsweise ist die Laserquelle ein Titan-Saphir-Laser oder ein Cr : LiSrAlF₆-Laser.

Vorzugsweise ist die erste optische Faser eine Monomodenfaser bei der Wellenlänge des Hauptstrahls.

Vorzugsweise ist die Strahlteilereinrichtung ein optischer

Koppler und stärker bevorzugt ein geschweißter Doppelkonus-Taperkoppler.

Vorzugsweise teilt die Strahlteilereinrichtung den Hauptstrahl etwa gleich in den ersten und zweiten Strahl.

Vorzugsweise ist die optische Kopplereinrichtung ein optischer Koppler und stärker bevorzugt ein geschweißter Doppelkonus-Taperkoppler.

Vorzugsweise sind die Strahlteilereinrichtung und die optische Kopplereinrichtung durch einen einzelnen optischen Koppler und stärker bevorzugt durch einen einzelnen geschweißten Doppelkonus-Taperkoppler gebildet.

Vorzugsweise verfügt die Antidispersionseinrichtung über eine Umkehrchirp-Bragg-Gitterfaser, deren enger beabstandete Gitter optisch näher an der Strahlteilereinrichtung angeordnet sind, und stärker bevorzugt über eine erste und zweite Umkehrchirp-Bragg-Gitterfaser, eine zum Empfangen des jeweiligen ersten und zweiten Strahls, deren jeweilige enger beabstandete Gitter optisch näher an der Strahlteilereinrichtung angeordnet sind.

Dadurch können Bragg-Gitterfasern verwendet werden, um den ersten und zweiten Strahl zu komprimieren. Diese wirken auch als dichroitische Spiegel zum Auswählen des durch ein Gewebe oder eine andere Probe emittierten Fluoreszenzlichts durch dichroitische Strahlteilung.

Vorzugsweise weist das Endoskop oder Mikroskop ferner eine optische Faser mit großem Durchmesser und einen Mantelmodenkoppler auf, wobei der Mantelmodenkoppler die zweite optische Faser und die Faser mit großem Durchmesser so koppelt, daß Weitwinkel-Streulicht vom Kopf durch den Koppler im wesentlichen in die Faser mit großem Durchmesser zur Übertragung zu einem Photodetektor eingekoppelt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Endoskop oder Mikroskop eine optisch nach der zweiten optischen Faser angeordnete Kompressionseinrichtung zum Komprimieren des rekombinierten Strahls auf, nachdem der rekombinierte Strahl die zweite optische Faser verläßt, wodurch die Spitzenleistung des Hauptstrahls innerhalb der ersten optischen Faser und des rekombinierten Strahls in der zweiten optischen Faser reduziert ist.

Vorzugsweise weist das Endoskop oder Mikroskop ferner eine optisch vor der ersten optischen Faser angeordnete Dispersionseinrichtung zum Dispergieren des Hauptstrahls auf, bevor der Hauptstrahl in die erste optische Faser eintritt.

Die Dispersionseinrichtung und/oder die Kompressionseinrichtung weisen vorzugsweise einen Glasblock, ein Gitter oder ein Prisma auf.

Vorzugsweise weisen die Dispersionseinrichtung und/oder Kompressionseinrichtung hochdispergierendes Glas auf.

In einer speziellen Ausführungsform haben die erste optische Faser und die zweite optische Faser jeweils einen Kern mit großem Durchmesser und damit niedriger V-number, um die Flächenleistungsdichte in den Kernen zu reduzieren.

In einer weiteren speziellen Ausführungsform haben die erste optische Faser und die zweite optische Faser reine Siliziumoxidkerne und fluoriddotierte Mäntel, um nichtlineare optische Effekte innerhalb der Fasern zu minimieren.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Endoskop oder Mikroskop bereitgestellt, das aufweist:

eine Dispergiereinrichtung zum zeitweiligen spektroskopischen Dispergieren eines gepulsten Hauptlaserstrahls; und eine optische Faser zum Übertragen des dispergierten Hauptstrahls zu einem Endoskop- oder Mikroskopkopf und Reduzieren der Dispersion durch Komprimieren des dispergierten Hauptstrahls.

Statt zunächst zu erlauben, daß Dispersion in einer optischen Faser usw. auftritt und dann diese Dispersion zu kor-

rigieren, kann somit die Dispersion anfangs in eine Gegenrichtung eingeführt und dann bei der Übertragung des Strahls durch die Faser zur Probe entfernt werden.

Die optische Faser kann die durch die Dispergiereinrichtung eingeführte Dispersion im wesentlichen umkehren. Alternativ kann der Endoskop- oder Mikroskopkopf eine optisch nach der optischen Faser angeordnete Kompressionseinrichtung zum Fördern oder Abschließen der Kompression des dispergierten Hauptstrahls aufweisen, um die Spitzenleistung des Hauptstrahls innerhalb der optischen Faser zu reduzieren.

Vorzugsweise ist die Dispergiereinrichtung auch eine Strahlteilereinrichtung zum Auswählen des durch ein Gewebe oder eine andere Probe emittierten Fluoreszenzlichts.

Vorzugsweise weist die Dispergiereinrichtung ein Paar Beugungs- oder Brechungselemente und stärker bevorzugt ein Paar Blaze-Gitter und ein Prisma auf.

Erfindungsgemäß wird außerdem ein Endoskop oder Mikroskop mit einem Kopf bereitgestellt, wobei das Endoskop oder Mikroskop aufweist:

eine Saug- oder Unterdruckquelle, die nahe dem Kopf angeordnet ist;

eine Lichtauffangeinrichtung zum Auffangen von Licht von einer Probe; und

eine Probenaufnahmeeinrichtung, die mit der Saugquelle gekoppelt ist, zum Aufnehmen der Probe, wenn die Probe durch die Saugquelle daran gedrückt wird;

wobei die Saugquelle verwendet wird, um die Probe zur Aufnahmeeinrichtung zu drücken, wodurch die Probe so verformt wird, daß die Lichtauffangeinrichtung einen Teil des durch die Probe vom Kopf weg emittierten Lichts auffangen kann.

Vorzugsweise ist die Probenaufnahmeeinrichtung napfförmig oder alternativ kegelstumpfförmig.

Vorzugsweise ist die Lichtauffangeinrichtung im Gebrauch durch die Probenaufnahmeeinrichtung von der Probe getrennt, und die Probenaufnahmeeinrichtung ist für das Licht zwischen der Probe und der Lichtauffangeinrichtung im wesentlichen durchlässig.

Die Lichtauffangeinrichtung kann eine optische Faser aufweisen.

Alternativ kann die Lichtauffangeinrichtung einen Spiegel aufweisen. Das Endoskop oder Mikroskop kann eine Linse zum Fokussieren von Licht vom Spiegel aufweisen.

Vorzugsweise ist die Lichtauffangeinrichtung eine von mehreren Lichtauffangeinrichtungen.

Außerdem stellt die Erfindung ein Verfahren zur Zweiphotonen-Endoskopie oder Mikroskopie mit den folgenden Schritten bereit:

1) Übertragen eines gepulsten Hauptlaserstrahls längs einer optischen Faser;

2) Teilen des Hauptstrahls in einen ersten und zweiten Strahl;

3) Komprimieren des ersten und zweiten Strahls;

4) Kombinieren mindestens eines Abschnitts des ersten und zweiten Strahls;

5) Übertragen des ersten und zweiten Strahls längs einer optischen Faser zu einem Endoskop- oder Mikroskopkopf.

In einer spezifischen Ausführungsform stellt die Erfindung ein Endoskop- oder Mikroskopsystem bereit, das aufweist:

ein Endoskop oder Mikroskop mit einem Photodetektor;

eine Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung von Umgebungsbeleuchtung;

eine Schalteinrichtung zum Ein- und Ausschalten der Be-

leuchtungseinrichtung; und eine Synchronisationseinrichtung zum Synchronisieren der Schalteinrichtung mit Erfassungsperioden des Endoskops oder Mikroskops;

wobei die Synchronisationseinrichtung so betreibbar ist, daß sie die Schalteinrichtung steuert, um die Beleuchtungseinrichtung während der Erfassungsperioden aus- und zwischen aufeinanderfolgenden Erfassungsperioden einzuschalten.

Vorzugsweise ist die Synchronisationseinrichtung so betreibbar, daß sie die Schalteinrichtung steuert, um die Beleuchtungseinrichtung so zu schalten, daß die Beleuchtungseinrichtung während der Rücklaufperiode des Endoskops oder des Mikroskops eingeschaltet ist.

Der Photodetektor kann so betreibbar sein, daß er ausgeschaltet ist, wenn die Beleuchtungseinrichtung eingeschaltet ist.

Vorzugsweise hat der Photodetektor eine Stromversorgung, die so betreibbar ist, daß sie ausgeschaltet ist, wenn die Beleuchtungseinrichtung eingeschaltet ist.

Vorzugsweise weist der Photodetektor eine Photovervielfacherröhre auf, und die Stromversorgung ist eine Hochspannungs-Stromversorgung (EHT-Stromversorgung). In einer weiteren spezifischen Ausführungsform stellt die Erfindung ein Endoskop- oder Mikroskopsystem bereit, das aufweist:

ein Endoskop oder Mikroskop mit einem Photodetektor; eine Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung von Umgebungsbeleuchtung; und eine Filtereinrichtung zum Reduzieren der Detektion der Umgebungsbeleuchtung durch den Photodetektor.

Vorzugsweise emittiert die Beleuchtungseinrichtung Licht, das durch die Filtereinrichtung bevorzugt blockiert wird.

Alternativ ist die Filtereinrichtung eine erste Filtereinrichtung, und das System verfügt über eine zweite Filtereinrichtung zum Absorbieren von Licht von der Beleuchtungseinrichtung, das durch die erste Filtereinrichtung bevorzugt durchgelassen wird, und Übertragen von Licht von der Beleuchtungseinrichtung, das durch die Filtereinrichtung bevorzugt blockiert wird.

Vorzugsweise weist das System eine Schalteinrichtung zum Ein- und Ausschalten der Beleuchtungseinrichtung und eine Synchronisationseinrichtung zum Synchronisieren der Schalteinrichtung mit Erfassungsperioden des Endoskops oder Mikroskops auf, wobei die Synchronisationseinrichtung so betreibbar ist, daß sie die Schalteinrichtung steuert, um die Beleuchtungseinrichtung während der Erfassungsperioden aus- und zwischen aufeinanderfolgenden Erfassungsperioden einzuschalten.

Vorzugsweise weist das System ferner eine Verschlubeinrichtung zum Abdecken des Photodetektors auf, wobei die Synchronisationseinrichtung so betreibbar ist, daß sie die Verschlubeinrichtung steuert, um den Photodetektor abzudecken, wenn die Beleuchtungseinrichtung eingeschaltet ist, und den Photodetektor während der Erfassungsperioden freizulegen.

Dadurch wird die Lichtdetektionseinrichtung (allgemein eine Photovervielfacherröhre) vor Belichtung mit dem Umgebungslicht im Verlauf von Nichterfassungsperioden geschützt, um Rauschpegel zu reduzieren.

Zur Verdeutlichung der Erfindung werden im folgenden bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung als Beispiele anhand der beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1A eine schematische Ansicht eines optischen Zweiphotonen-Faserendomikroskops gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 1B eine schematische Ansicht eines optischen Zweiphotonen-Faserendomikroskops gemäß einer alternativen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 2A eine schematische Ansicht eines optischen Zweiphotonen-Faserendomikroskops gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 2B eine nähere Ansicht mit dem Kopf des Endomikroskops von **Fig. 2A**;

Fig. 3A eine schematische Ansicht eines optischen Zweiphotonen-Faserendomikroskops gemäß noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 3B eine vergrößerte Ansicht einer Einzelheit von **Fig. 3A**;

Fig. 4 eine Ansicht eines Abschnitts eines Endomikroskops gemäß noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung;

Fig. 5 eine Ansicht der Endomikroskop-Kopf-anordnung zur Verwendung mit dem Endomikroskop von **Fig. 2** oder **3**;

Fig. 6 eine Ansicht einer weiteren Endomikroskop-Kopf-anordnung zur Verwendung mit dem Endomikroskop von **Fig. 2** oder **3**;

Fig. 7 eine Ansicht einer Endomikroskop-Kopf-anordnung zur Verwendung mit einem erfindungsgemäßen Endomikroskop;

Fig. 8 eine Ansicht einer weiteren Endomikroskop-Kopf-anordnung zur Verwendung mit einem erfindungsgemäßen Endomikroskop;

Fig. 9 eine Ansicht noch einer weiteren Endomikroskop-Kopf-anordnung zur Verwendung mit einem erfindungsgemäßen Endomikroskop;

Fig. 10 eine Ansicht einer anderen Endomikroskop-Kopf-anordnung zur Verwendung mit einem erfindungsgemäßen Endomikroskop, die eine Variante der Anordnung von **Fig. 9** ist;

Fig. 11A, 11B und 11C schematische Diagramme zur Darstellung eines Verfahrens zur Verwendung eines erfindungsgemäßen Endomikroskops; und

Fig. 12 eine Ansicht eines Abschnitts eines Endomikroskops gemäß noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung.

Ein optisches Zweiphotonen-Faserendomikroskop gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist schematisch bei **10** in **Fig. 1A** gezeigt. Das Endomikroskop **10** verfügt über eine Laserquelle in Form eines Femtosekundenlasers **12** zum Erzeugen eines schnell gepulsten Strahls **14**, eine Linse **16** zum Fokussieren des Strahls **14** und eine optische Faser **20** mit einem Kern **18**. Die Linse **16** dient dazu, den Strahl **14** in den Kern **18** zu fokussieren. Die optische Faser **20** ist eine Monomodenfaser bei der Wellenlänge des Lasers **12**.

Jeder Impuls des Strahls **14** durchläuft die Faser **20** zu einem Strahlteiler in Form eines geschweißten Doppelkonus-Taperkopplers **22**. Der Koppler **22** teilt den Hauptstrahl **14** etwa gleichmäßig in zwei Strahlen auf, so daß Impulse jedes dieser Strahlen vom Koppler **22** längs der beiden Ausgangszweige des Kopplers, optischen Fasern **24** bzw. **26**, übertragen werden. Die optischen Fasern **24** und **26** weisen jeweils eine Antidispersionseinrichtung in Form von Umkehrchirp-Bragg-Gitterfasern **28** bzw. **30** auf, die mit den kürzer beabstandeten Gitterelementen **28a** und **30a** näher am Koppler **22** als mit den länger beabstandeten Gitterelementen **28b** und **30b** angeordnet sind. Dadurch treffen die Impulse jedes dieser Strahlen nach Verlassen des Kopplers **22** auf ein Gitter **28** bzw. **30**.

Die Impulse werden von den Gittern **28** und **30** zurück zum Koppler **22** reflektiert, wobei die blauen, kürzeren Wellenlängenkomponenten jedes Impulses den roten, längeren Wellenlängenkomponenten des Impulses voreilen. Am

Koppler 22 treffen die Impulse nahe beieinander, aber nicht genau gleichphasig ein. Versucht wird nicht, die Faserentfernungen von den Bragg-Gittern 28 und 30 zum Koppler 22 genau anzugleichen. Jeder Impuls wird durch den Koppler 22 erneut so aufgeteilt, daß zwei (eine Komponente jedes von den Gittern 28 und 30 reflektierten Impulses) längs der Faser 20 zurück zum Laser 12 geleitet werden und zwei Impulse (ebenfalls eine Komponente jedes von den Gittern 28 und 30 reflektierten Impulses) längs einer Faser 32 geleitet werden. Die Impulse in der Faser 32 bündeln sich allmählich, wenn die roten Komponenten die blauen einholen. Die eine Faserspitze 34 verlassenden Impulse sind damit nahezu als ein Impuls rekombiniert (unter Berücksichtigung der Kompensation letzter chromatischer Differenzverzögerungen in Linsen 36 und 38 des Endomikroskopkopfs 40).

Die längs der Faser 32 geleiteten Impulse werden durch die Linsen 36 und 38 zu einer Gausschen Einschnürung 42 innerhalb des zu untersuchenden Gewebes 44 fokussiert. Das Abtasten der Gausschen Einschnürung 42 innerhalb des Gewebes kann durch einen Mechanismus 46 erreicht werden, der Bewegungen der Faserspitze 34 in einem Raster auslöst, oder durch Spiegelabtastung oder eine andere gewünschte Abtastmustererzeugung.

An der Gausschen Einschnürung 42 durch Zweiphotonenanregung von Fluorophoren innerhalb des Gewebes 44 erzeugte Fluoreszenz läuft durch die Linsen 38 und 36 zurück und wird in den Kern der Faser 32 zurück fokussiert. Danach durchläuft das Fluoreszenzlicht die Faser 32 zum Koppler 22. Anschließend wird es durch den Koppler 22 geteilt und durchläuft die Fasern 24 und 26. Das Fluoreszenzlicht, das eine viel kürzere Wellenlänge als der Hauptstrahl 14 hat, durchläuft die Bragg-Spiegel 28 und 30 (die somit als dichroitische Strahlteiler wirken) zu den Enden 48 und 50 der Fasern 24 und 26, von denen es zur Photovervielfacherröhre 52 läuft, nachdem es ein BG39-Spektralfilter 54 durchlaufen hat. Für dieses System sind herkömmliche Fasern mit Acrylbeschichtung und Kommunikationskoppler recht geeignet.

Ein optisches Zweiphotonen-Faserendomikroskop gemäß einer alternativen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist schematisch in Fig. 1B gezeigt, in der gleiche Bezugszahlen zur Bezeichnung gleicher Komponenten wie in Fig. 1A dienen. Im Gegensatz zur Ausführungsform von Fig. 1A sind aber eine Dispergiereinrichtung mit einem ersten und zweiten Blaze-Gitter 55a und 55b sowie ein 90°-Retroreflektorprisma 56 optisch zwischen dem Laser 12 und der Linse 16 angeordnet. Die Stellen von Maxima im Licht, das durch das erste Gitter 55a gebeugt wird, sind wellenlängenabhängig, so daß der Strahl 14 räumlich wirksam in seine Bestandteilsfrequenzen aufgeteilt wird: Schematisch ist dies mit Licht 14a kürzerer Wellenlänge und Licht 14b längerer Wellenlänge dargestellt. Danach wird der Strahl durch das zweite Gitter 55b zum Prisma 56 (oder alternativ zu einem Spiegel) reflektiert, das das Licht über das zweite Gitter 55b zum ersten Gitter 55a zurückführt. Die Kombination aus den Gittern 55a und 55b und dem Prisma 56 führt eine Wegdifferenz zwischen den Komponenten 14a und 14b des Strahls 14 mit kürzerer und längerer Wellenlänge und einen Versatz am ersten Gitter 55a ein, so daß der Strahl danach zur Linse 16 gerichtet wird. Die Linse 16 fokussiert die Komponenten der jetzt dispergierten Strahlimpulse in eine optische Faser 58, wobei die Komponenten kürzerer Wellenlänge den Komponenten längerer Wellenlänge voreilen. Bei der Bewegung dieser Komponenten längs der Faser 58 holen die Komponenten längerer Wellenlänge allmählich die Komponenten kürzerer Wellenlänge ein. Damit sind die eine Faserspitze 59 verlassenden Impulse nahezu wieder als ein Impuls rekombiniert (unter Berücksichtigung der Kom-

pensation letzter chromatischer Differenzverzögerungen in den nachfolgenden Linsen des Endomikroskopkopfs gemäß der vorstehenden Diskussion).

Wie in der Ausführungsform von Fig. 1A wird in der Probe erzeugte Fluoreszenz in den Kern der Faser 58 zurück fokussiert, durchläuft die Faser 58 zur Linse 16 und wird vom ersten Gitter 55a zur Photovervielfacherröhre 52 reflektiert, nachdem sie ein (nicht gezeigtes) BG39-Spektralfilter durchläuft. Die zurückgeführte Fluoreszenz ist zweiphotoneninduziert, so daß sie einen anderen Wellenlängenbereich als der Strahl 14 hat. Somit wird sie in einem anderen Winkel als der gepulste Strahl 14 gebeugt und läßt sich durch die Photovervielfacherröhre 52 zweckmäßig detektieren, ohne den optischen Weg der Komponenten 14a und 14b des Strahls 14 zu stören.

In Fig. 2A ist ein Endomikroskop gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung bei 60 dargestellt. Das Endomikroskop 60 ähnelt dem Endomikroskop 10 von Fig. 1A und verfügt über eine Laserquelle 62, eine Linse 64, eine optische Faser 66, einen Koppler 68 mit zwei Ausgangszweigen (Fasern 70 und 72), die jeweils eine Umkehrchirp-Bragg-Gitterfaser 74 und 76 aufweisen, außer daß das letzte Teilstück einer optischen Glasmantelfaser 78, das vom Koppler 68 zum Endomikroskopkopf 80 führt, mit einem (in der Darstellung nicht gezeigten) Material niedriger Brechzahl, z.B. Silikongummi niedriger Brechzahl, ummantelt ist, was die Übertragung von Mantelmoden erlaubt. Gepulstes Laserlicht, das aus einer Faserspitze 82 austritt, wird durch Linsen 84 und 86 zu einer Gausschen Einschnürung 88 im Gewebe 90 fokussiert.

Infolge von "Schlangenlicht" 92 (Vorwärtsstreuung des 2 ω -angeregten Fluoreszenzlichts mit geringem Winkel) das vom Gausschen Einschnürbereich 88 emittiert wird, verfehlt ein Großteil der Fluoreszenz den Kern 94 der Faser 78 beim Rücklauf, tritt aber in den Glasmantel der Faser 78 ein. Diese Schlangenlichtstrahlen sind durch den Silikongummi-mantel niedriger Brechzahl begrenzt und breiten sich als Mantelmoden 96 und 98 aus, bis sie auf einen Mantelmodenkoppler 100 treffen.

An diesem Punkt weist das Endomikroskop 60, gekoppelt durch den Mantelmodenkoppler 100 mit der Faser 78, eine Faser 102 mit großem Durchmesser auf. Dadurch werden die Mantelmoden 96 und 98 zum Großteil in die Faser 102 mit großem Durchmesser ausgekoppelt und bewegen sich längs dieser Faser 102 zur Photovervielfacherröhre 104, die ein Signal für ein (nicht gezeigtes) geeignetes Bildertassungssystem erzeugt.

Fig. 2B ist eine nähere Ansicht des Endomikroskopkopfs 80 von Fig. 2A. Erzeugte Zweiphotonenfluoreszenz 92 wird am Lasertokalfpunkt 88 im Gewebe 90 emittiert. Die Zweiphotonenfluoreszenz kürzerer Wellenlänge unterliegt einer stärkeren Vorwärtsstreuung in kleinem Winkel ("Schlangenstreuung"), wodurch sich beschreibungsgemäß das die Linsen 86 und 84 des Endomikroskopkopfs 80 durchlaufende Rücklauflicht nicht zum Kern 94 der Faser 78 refokussiert. Statt dessen tritt das Schlangenstreuunglicht in den Glasmantel 95 ein und wird durch den durchsichtigen Silikongummi-mantel 106 niedriger Brechzahl eingefangen. Ein Mantelmodenkoppler 100 übernimmt den größten Teil dieses Lichts in die Faser mit großem Durchmesser und führt es zur Photovervielfacherröhre 104.

Fig. 3A ist eine Ansicht noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Endomikroskops 110. In dieser Ausführungsform weist das Endomikroskop 110 ein sehr flachwinkliges Prisma 112 auf, das im optischen Weg zwischen den Linsen 114 und 116 eingefügt ist.

Ansonsten ähnelt das Endomikroskop 110 dem Endomi-

Endomikroskop 60 von Fig. 2A und 2B. Somit verfügt das Endomikroskop 110 über eine Laserquelle 118, eine Linse 120, eine optische Faser 122, einen Koppler 124 mit zwei Ausgangszweigen (Fasern 126 und 128), die jeweils eine Umkehrchirp-Bragg-Gitterfaser 130 und 132 aufweisen, und eine optische Faser 134 vom Koppler 124 zu einem Endomikroskopkopf 136. Die optische Faser 134 hat einen Glasmantel 138 (der Einfachheit halber nur im Bereich eines Mantelmodenkopplers 140 und des Endomikroskopkopfs 136 gezeigt).

Außerdem weist das Endomikroskop 110 den genannten Mantelmodenkoppler 140 und eine Faser 142 mit großem Durchmesser auf.

Das Prisma 112 hat keine ausreichende Dispersion, um den Anregungsstrahl am Gausschen Einschnürbereich 144 erheblich zu verteilen, lenkt aber die kürzeren Fluoreszenzwellenlängen um einen ausreichenden Betrag so ab, daß sie seitenversoben zur Seite 146 des die Anregungswellenlängen emittierenden Kerns 148 zurückgeführt werden.

Dadurch ist gewährleistet, daß die meiste oder sämtliche 2 ω -angeregte Fluoreszenz als Mantelmoden in der Lichtzufuhrfaser 134a zurückgeführt wird. Diese Moden werden durch den Mantelmodenkoppler 140 in die Faser 142 mit großem Durchmesser ausgekoppelt und durch die Faser 142 zur Photovervielfacherröhre 150 geführt.

Damit wäre ein einfacherer optischer Rückweg für die Fluoreszenz gegeben, der völlig über die Faser des Mantelmodenkopplers 140 verläuft.

Obwohl nicht gezeigt, könnte ein ähnlicher Effekt erreicht werden, ohne das Prisma 112 zu benötigen, wenn die Linsen 114 und 116 einen geringen chromatischen Aberrationswert haben.

Fig. 3B ist eine vergrößerte Ansicht des Endomikroskopkopfs 136 von Fig. 3A mit der Faser 138, der Faser 142 mit großem Durchmesser und dem Mantelmodenkoppler 140. In dieser Darstellung ist die Seitenverschiebung der Fluoreszenzstrahlen kürzerer Wellenlänge zur Seite 146 des Kerns 148 der Faser 138 deutlicher.

Fig. 4 ist eine schematische Ansicht eines Endomikroskops 160 gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung. Das Endomikroskop 160 verfügt über eine Laserquelle in Form eines Ti:Saphir-Lasers 162 zum Bereitstellen eines Laserstrahls 164, eine Fokussierlinse 166 und eine optische Faser 168. Die optische Faser 168 richtet den Strahl 164 zu einem geschweiften Doppelkonus-Taperkoppler 170, der den Strahl 164 in zwei etwa gleiche Strahlen teilt, die durch Fasern 172 bzw. 174 geleitet werden. Wie in anderen zuvor beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen weisen die Fasern 172 und 174 jeweils eine Umkehrchirp-Bragg-Gitterfaser 176 bzw. 178 auf. Diese Bragg-Gitter 176 und 178 sind mit den kürzer beabstandeten Gitterelementen 176a und 178a näher am Koppler 170 als mit den länger beabstandeten Gitterelementen 176b und 178b orientiert.

Vorgesehen ist ein Endomikroskopkopf 180, der durch eine optische Faser 182 optisch mit dem Koppler 170 verbunden ist. Fig. 4 veranschaulicht den Kopf 180 in seiner Anordnung zur Untersuchung einer Gewebeprobe 184.

Fluoreszenzlicht wird durch eine Photovervielfacherröhre 175 detektiert, nachdem es ein BG39-Spektralfilter 177 durchlaufen hat.

Außerdem weist das Endomikroskop 160 zwei Prismensätze 186 und 188 auf, die optisch zwischen dem Laser 162 und der Fokussierlinse 166 angeordnet sind.

Jeder Prismensatz 186 und 188 verfügt über ein Paar eng positionierte optische Keilprismen 186a, b bzw. 188a, b.

Die Prismen 186a, b und 188a, b sind auf Bahnen 187a, b bzw. 189a, b beweglich, entweder durch einen oder mehrere

Betätigungsmotoren (nicht gezeigt) oder manuell, so daß die vom Strahl zurückgelegte optische Weglänge innerhalb des Endomikroskops 160 eingestellt werden kann. Die Prismenbewegung verläuft parallel zu den schrägen benachbarten Flächen jedes Prismensatzes 186 oder 188. In der dargestellten Form dieser Ausführungsform sind alle vier Prismen beweglich. Der Einfachheit halber kann aber bevorzugt sein, daß die Prismen 186a und 188a oder 186b und 188b beweglich sind.

Die Prismen 186a und 186b bestehen aus Quarzglas oder Germanium-dotiertem Siliziumdioxid (oder einem anderen Material mit relativ linearer Dispersion) und können so eingestellt werden, daß sie die Variabilität der Gesamtweglänge zwischen Systemen kompensieren.

Die Prismen 188a und 188b sind aus Flintglas oder einem anderen Material mit stark gewölbten Dispersionskurven hergestellt und können hinein- und herausbewegt werden, um die Chirplinearität einzustellen. Beide Prismensätze 186 und 188 sind einzusetzen, um Abweichungen der optischen Weglängenentfernung im Glas und auch Abweichungen zu kompensieren, die eingeführt werden könnten, wenn die letzten Linsen 190 und 192 des Kopfs 180 gewechselt werden.

Danach erlauben die Prismensätze 186 und 188 (mittels der Bragg-Gitterfasern 176 und 178) die Abstimmung des überkompensierten Systems. Außerdem können mit den Prismensätzen 186 und 188 Einstellungen der optischen Weglängenentfernung vorgenommen werden, um die Variabilität zwischen den Fasersystemen innerhalb der optischen Weglängenentfernung zu halten.

Fig. 5 ist eine Ansicht des Kopfbereichs eines Endomikroskops gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung im Gebrauch. In dieser Ausführungsform nutzt das Endomikroskop eine Saugwirkung, um zu untersuchendes Gewebe in einen Napf einzuziehen, der benachbart zur optischen Frontfläche des Endomikroskopkopfs vorgesehen ist.

So weist das Endomikroskop dieser Ausführungsform einen Kopf 200 mit Linsen 202 und 204 sowie einer optischen Frontplatte 206 auf. Vorgesehen ist ferner ein Saugschlauch 208 (der an einer nicht gezeigten geeigneten Vakuum- oder Unterdruckquelle angeschlossen ist), um zu untersuchendes Gewebe 210 in einen Napf 212 einzusaugen, der durch eine transparente Wand 214 und die optische Frontplatte 206 des Endomikroskopkopfs 200 gebildet ist. Der Schlauch 208 ist am Napf 212 so angeschlossen, daß die durch den Schlauch 208 bereitgestellte Saugwirkung das Gewebe 210 in den Napf und an die Platte 206 zieht.

Eine oder mehrere optische Fasern 216a, b sind um die Wand 214 des Napfs 212 angeordnet, wobei ihre Enden zum Bereich weisen, der im Napf 212 untersucht wird. Diese Fasern 216 fangen das Fluoreszenzlicht von einem Fokalkpunkt 218 auf, das nicht in die Linse 204 eintritt und damit sonst nicht zum Signal beitragen würde. Dadurch wird mindestens ein Teil von solchem Licht, das zur Wand 214 gerichtet ist, durch die optischen Fasern 216 empfangen und zu einer Photovervielfacherröhre 220 übertragen.

Fig. 6 zeigt eine ähnliche Anordnung wie Fig. 5, die sich nur darin unterscheidet, daß ein Napf 222 kegelstumpfförmig ist und optische Fasern 224a, b jeweils getaperte "Strahlungsbündler"-Faserspitzen 226a, b haben, um den Durchmesser des zum Photodetektor 220 führenden Faserbündels zu verringern.

Fig. 7 ist eine schematische Ansicht einer erfindungsgemäßen Anordnung, in der zusätzliches Fluoreszenzlicht nicht dadurch aufgefangen wird, daß optische Fasern benachbart zum Fokalkpunkt des Lasers im untersuchten Gewebe platziert sind, sondern daß ein oder mehrere Spiegel

zum Einsatz kommen.

So weist ein Endoskopkopf 230, der über Linsen 232 und 234 verfügt und an einer optischen Faser 236 befestigt ist, auch Spiegel 238a, b auf, die sich am vorderen Ende 240 des Kopfes 230 befinden. Fluoreszenzlicht, das in der Ausführungsform von Fig. 5 und 6 von den Fasern 216 oder 224 eingefangen würde, wird statt dessen durch die Spiegel 238 in Fasern 242a, b reflektiert, die sich parallel zur Hauptachse des Endomikroskopkopfs 230 erstrecken. Linsen 244a, b sind zwischen den Spiegeln 238a, b bzw. Fasern 242a, b angeordnet, um Licht in die Fasern 242a, b zu fokussieren und damit möglichst viel Licht einzufangen.

Allerdings sind diese Linsen 244 fakultativ, und gemäß Fig. 8 kann es (zwecks Kompaktheit oder leichten Gewichts des Endomikroskopkopfs oder aus anderen Gründen) erwünscht sein, sie auszuschließen. Eine solche Anordnung ist in Fig. 8 gezeigt, in der Bezugswahlen denen von Fig. 7 entsprechen.

Die Anordnungen von Fig. 7 und 8 vermeiden gebogene Fasern, die wie in den Ausführungsformen von Fig. 5 und 6 von dem die Spitze umgebenden Bereich ausgehen.

Jedoch können diese Anordnungen auch einen Saugschlauch und einen Napf (z. B. gemäß Fig. 5 und 6) verwenden, wobei die Spiegel 238 benachbart zum Napf und außerhalb davon angeordnet sind.

Zu beachten ist, daß in jeder der Ausführungsformen unter Einsatz von Saugwirkung, um Gewebe in einen Napf einzusaugen, das Auffangen von Licht aus einem Raumwinkel erfolgen kann, der 2π Sterad übersteigt, d. h. ein viel höherer Auffangwirkungsgrad als der, der für ein herkömmliches LSCM-Einphotonenendoskop möglich ist.

Durch "Napfziehen" infolge von Vakuum- oder Saugwirkung kann es in der Tendenz dazu kommen, daß der zu untersuchende Bereich mit Blut anschwillt, indem das Mikrovaskulärsystem künstlich dilatiert wird. Potentiell verringert sich dadurch der Signalpegel aus der Fluoreszenz, da Hämoglobin starke Absorptionsbanden im blauen, grünen und gelben Bereich hat. Ein Weg zur Überwindung dieses Problems wäre der Einsatz eines Fadens um den Rand des "Napfs". Durch Zusammenziehen dieses Fadenrings wird ein "Knopf" aus Gewebe komprimiert und das Blut bis zum Erbleichen herausgequetscht, während der Kontakt des Gewebes mit der optischen Frontfläche des Endomikroskops immer noch erhalten bleibt.

Eine alternative Möglichkeit, einen oder mehrere dieser Vorteile (größerer Raumwinkel beim Lichteinfang und Ausschluß zusätzlichen Bluts) zu realisieren, ist das Einklemmen und Festhalten eines Probengewebelappens an der ersten optischen Oberfläche des Endomikroskops. In diesem Fall läßt sich optischer Rücklauf auch von der Lappenrückseite erhalten. Beispiele für diese Ausführungsformen sind in Fig. 9 und 10 gezeigt.

In einer Ausführungsform der Erfindung (die in Fig. 9 dargestellt ist) ist das Endomikroskop mit einer Einklemmeinrichtung in Form von transparenten Platten 250 und 252 zum Einklemmen einer Gewebeprobe 254 versehen. Außerdem dient die Platte 250 als vorderes optisches Element eines Endomikroskopkopfs 256, der auch Linsen 258 und 260 aufweist. Der Kopf 256 ist an einer optischen Faser 262 befestigt, aus der ein gepulster Laserstrahl abgegeben wird.

Weiterhin verfügt diese Anordnung über einen ersten Spiegel 264, der hinter der Platte 252 angeordnet ist, eine Linse 266 und einen zweiten Spiegel 268. Fluoreszenzlicht, das aus dem Gewebe 254 durch die Platte 252 zurückgestreut wird, wird durch den Spiegel 264 reflektiert, durch die Linse 266 fokussiert und dann durch den zweiten Spiegel 268 in eine optische Faser 270 reflektiert, was den detektierten Gesamtstrahlwinkel erhöht.

Werden die Platten 250 und 252 stärker an das Gewebe 254 gedrückt, lassen sie das Gewebe 254 gemäß der vorstehenden Beschreibung erbleichen, was die übermäßige Blutansammlung im Gewebe 254 reduziert.

Deutlich ist, daß die Spiegel 264 und 268 in dieser Anordnung entfallen könnten und Licht durch die Linse 266 direkt in die Faser 270 fokussiert werden könnte, indem die Linse 266 gegenüber der Position von Fig. 9 im 90°-Winkel orientiert und die Faser 270 direkt hinter der Platte 252 angeordnet wird. Wegen ihrer größeren Kompaktheit ist die gezeigte Anordnung aber bevorzugt.

Alternativ könnten die Spiegel 264 und 268, die Linse 266 und die Faser 270 entfallen, wenn die Platte 252 durch eine Retroreflektorplatte gemäß Fig. 10 ersetzt wird.

In dieser Anordnung ist das Gewebe 254 wiederum eingespannt, aber zwischen der Platte 250 und einer Retroreflektorplatte 272. Eine Retroreflektorplatte vermag Licht in Parallelrichtung zur Einfallsrichtung, aber räumlich verschoben, zurück zu reflektieren. Dadurch wird aus dem Gewebe 254 zurück zur Platte 272 gestreutes Licht durch das Gewebe 254 zurück reflektiert und durch ein geeignetes Verfahren aufgefangen, z. B. die zuvor anhand von Fig. 1, 2A, 3A oder 4 beschriebenen.

Aufgrund des breiten Winkelbereichs beim optischen Auffangen können aber die Eckenkuben 274 der Retroreflektorplatte 272 nicht auf interne Totalreflexion bauen, weshalb die Retroreflektorplatte 272 metallisiert ist.

Nunmehr wird ein Verfahren zur Erleichterung des Einsatzes des Zweiphotonen-Endomikroskops in Situationen, in denen ein hoher Beleuchtungspegel bei klinischen Untersuchungen benötigt wird, anhand von Fig. 11A, 11B und 11C beschrieben.

Bei der konfokalen Einphotonenmikroskopie und -endomikroskopie wird das Rücklauflicht durch die Lochblende räumlich gefiltert, was Störungen aus Raumlicht wirksam beseitigt. Im Zweiphotonen-Endomikroskop wäre es wünschenswert, eine größere Apertur zu haben, um "schlangenförmig gestreute" Rücklaufphotonen aufzufangen und das Signal zu verstärken. Allerdings kann dies zu einem höheren Pegel von Umgebungsfalschlicht führen, insbesondere wenn ein vernünftig hoher Beleuchtungspegel in der klinischen Untersuchungsumgebung erforderlich war. Besonders wichtig kann dieser Effekt sein, wenn zusätzliche Fasern zum Einsatz kommen, um den Signalwert zum Photodetektor wie in der Ausführungsform der Erfindung von Fig. 5 bis 8 zu erhöhen.

Sowohl bei Endoskopen als auch bei Mikroskopen (u. a. Endomikroskopen) läßt sich dieser Effekt reduzieren, indem der Kopf oder die Objektivlinse in eine Hülle oder andere Abdeckung eingeschlossen wird, die das untersuchte Gewebe umgibt oder im wesentlichen daran abdichtbar ist. Wird aber Umgebungslicht immer noch detektiert, läßt sich dieser Effekt weiter reduzieren oder beseitigen, indem die allgemeine oder Umgebungsbeleuchtung von einer Lichtquelle geliefert wird, die Licht nur während der Rücklaufperiode des Systems erzeugt, z. B. ein System vom Stroboskop-Typ. Unter extremen Umständen könnten auch die Photovervielfacherröhrenspannungen (PMT-Spannungen) während der Rücklaufbeleuchtungsperiode unterbrochen werden, um PMT-Sättigung und Überlastung zu verhindern.

Alternativ oder zusätzlich kann die Raumbeleuchtung Licht einer Farbe oder eines Bereichs von Farben sein, und die PMT könnte mit einem Filter versehen sein, das diese Farbe(n) nicht wesentlich durchläßt. So könnte z. B. die Umgebungsbeleuchtungsquelle eine Rotlichtquelle oder eine Lichtquelle hinter einem Rotfilter sein, und die PMT könnte mit einem Blau- oder Blau-/Grünfilter versehen sein.

Ferner kann zur Reduzierung der Lichtpegel, die auf die

PMT in Nichterfassungsperioden auftreten, jede dieser Techniken durch einen Verschuß (z. B. einen mechanischen Verschuß oder einen elektrooptischen Verschuß) über der PMT ergänzt sein. Dieser Verschuß wäre in Nichterfassungsperioden geschlossen (um die PMT vor Umgebungslicht zu schützen, das zu Rauschpegeln beitragen könnte), aber in Erfassungsperioden offen.

Fig. 11A ist eine grafische Darstellung der variierenden Position des Abtastspiegels eines Endomikroskops. Die Abtastposition ändert sich im wesentlichen als Sinuswelle 280 mit (in diesem Beispiel) einer Frequenz von 750 Hz.

Bilderfassungsperioden 282 und 284 sind in Fig. 11B gezeigt, wobei ihre Zeitsteuerung relativ zur Spiegelabtastposition durch Strichlinien 282a und 284a dargestellt ist.

Dadurch ist Umgebungsbeleuchtung auf jene Perioden beschränkt, in denen keine Erfassung erfolgt, was in Fig. 11C mit schraffierten Bereichen 286 und 288 gezeigt ist.

In einigen speziellen Anwendungen kann es erwünscht oder notwendig sein, hohe Strahlleistungen zu verwenden, z. B. können bei tiefer Gewebeabbildung bis zu 500 mW erwünscht sein. Allerdings können nichtlineare optische Effekte im Glas der Faser infolge von Eigenmodulation schwerwiegenden Leistungsverlust und kurze Wellenlängengenerzeugung bei Spitzenleistungen über etwa 50 mW bei einer Impulsrate von 100 fs in einer optischen Standardfaser bewirken.

Erfindungsgemäß läßt sich dieses Problem auf mehreren Wegen reduzieren.

Die erste dieser Anordnungen ist in Fig. 12 veranschaulicht, die ein Endomikroskop 290 ähnlich wie Fig. 4 zeigt. Klar sollte aber sein, daß diese und die weiteren nachfolgend beschriebenen Anordnungen mit Endomikroskopen gemäß jeder der Ausführungsformen der Erfindung verwendet werden können.

Gemäß Fig. 12 verfügt ein Endomikroskop 290 über eine Laserquelle 292, zwei Prismensätze 294 und 296, eine Fokussierlinse 298, eine erste optische Faser 300, einen Doppelkonus-Taperkoppler 302, Fasern 304 und 306 mit Umkehrchirp-Bragg-Gitterfasern 308 bzw. 310, die mit den kürzer beabstandeten Gitterelementen näher am Koppler 302 als mit den länger beabstandeten Gitterelementen orientiert sind, und einen Endomikroskopkopf 312, der mit dem Koppler 302 optisch durch eine zweite optische Faser 314 gekoppelt ist. Fig. 12 zeigt den Kopf 312 in der Anordnung zur Untersuchung einer Gewebeprobe 316. Von der Gewebeprobe 316 emittiertes Fluoreszenzlicht wird durch eine Photovervielfacherröhre 318 detektiert, nachdem es ein BG39-Spektralfilter 320 durchlaufen hat.

Das Endomikroskop 290 arbeitet ähnlich wie das Endomikroskop 160 von Fig. 4. Allerdings verfügt das Endomikroskop 290 zusätzlich über eine Dispersionseinrichtung in Form eines ersten Blocks 322 aus hochdispersierendem Glas, der zwischen der Laserquelle 292 und dem Prismenpaar 294 angeordnet ist, und eine Kompressionseinrichtung in Form eines zweiten Blocks 324 aus hochdispersierendem Glas, der innerhalb des Endomikroskopkopfs 312 zwischen der ersten Linse 326 und der zweiten Linse 328 angeordnet ist. Die Längen der ersten und zweiten optischen Faser 300 und 314 sind reduziert, damit zusätzliche Dispersionseffekte durch den ersten und zweiten Glasblock 322 und 324 eingeführt werden können.

Durchläuft der gepulste Strahl von der Laserquelle 292 den ersten Glasblock 322, wird der Strahl einer Anfangsdispersion unterzogen, bevor er in die erste optische Faser 300 eintritt. Dadurch reduziert sich die Spitzenleistung des Strahls in der ersten optischen Faser 300 gegenüber ihrem Wert ohne Verwendung des Glasblocks 322, wodurch nichtlineare optische Effekte im Glas der ersten und zweiten op-

tischen Faser 300 und 314 reduziert sind.

Im Gegensatz zum Endomikroskop 160, in dem die Rekompensation des Strahls praktisch bis zu der Zeit abgeschlossen ist, zu der der Strahl aus der zweiten optischen Faser 182 austritt, verläßt im Endomikroskop 290 der Strahl die zweite optische Faser 314 ohne abgeschlossene Rekompensation, so daß die Spitzenleistung in der zweiten optischen Faser 314 auf einem reduzierten Wert bleibt. Der zweite Glasblock 324 sorgt für die zusätzliche erforderliche Rekompensation erst, nachdem der Strahl die zweite optische Faser 314 verlassen hat, und das Problem nichtlinearer optischer Effekte innerhalb der zweiten Faser 314 ist umgangen.

Normalerweise bestehen die Glasblöcke 322 und 324 aus hochdispersierendem Bleiglas, wobei aber auch andere hochdispersierende Elemente geeignet sind, u. a. Gitter oder andere Prismenformen.

Wie zuvor erwähnt wurde, sind die Längen der ersten und zweiten optischen Faser 300 und 314 reduziert, um die Einführung der Glasblöcke 322 und 324 zu kompensieren. Jedoch ist zu beachten, daß die Länge der Glasblöcke 322 und 324 nicht gleich zu sein braucht, d. h., jede Ungleichheit ihrer Längen kann durch Einstellen der einzelnen Längen der ersten optischen Faser 300 und/oder zweiten optischen Faser 314 oder durch Einstellen der Gitter 308 und 310 kompensiert werden. In einigen Anwendungen kann es sehr erwünscht sein, die Länge des zweiten Glasblocks 324 zu minimieren, so daß dem Endomikroskopkopf 312 minimales Gewicht und minimale Länge zugefügt werden. In manchen Anwendungen kann es tatsächlich akzeptabel oder erwünscht sein, den ersten Glasblock 322 völlig entfallen zu lassen.

Eine zweite erfindungsgemäße Anordnung, durch die das Problem nichtlinearer optischer Effekte in der optischen Fasern reduziert werden kann, besteht in der Verwendung von Monomodenfaser mit einem Kern mit großem Durchmesser für die erste und zweite optische Faser (z. B. die Fasern 168 und 182 in der Ausführungsform von Fig. 4 oder die Fasern 300 und 314 in der Ausführungsform von Fig. 12). Damit hätten die erste und zweite Faser eine niedrige V-nummer und somit eine wirksam niedrige NA. Im Prinzip können solche Monomodenfaser mit einem Kern mit großem Durchmesser auch zwischen dem Koppler und den Bragg-Gittern verwendet werden, wobei dies aber nicht entscheidend ist, da an dieser Stelle im optischen Weg der Strahl stark dispersiert ist.

Daher ist die Flächenleistungsdichte im Kern reduziert, was das Problem nichtlinearer Effekte im Kern der ersten und zweiten optischen Faser beseitigt. Nachteilig bei dieser Anordnung ist, daß sich aufgrund des größeren Durchmessers der optischen Fasern nur allmählichere Kurven bzw. Bogen in der Faser herstellen lassen. In einigen Anwendungen ist dies aber möglicherweise nicht unzumutbar.

Ein drittes Verfahren zum Reduzieren des Problems nichtlinearer optischer Effekte in den optischen Fasern wäre der Einsatz optischer Fasern mit reinen Siliziumoxiddkernen und fluoriddorierten Mänteln, wobei in diesen Fasern nichtlineare Effekte im Vergleich mit herkömmlichen GeO_2 -dotierten Kernen mit reinen Siliziumoxiddmänteln reduziert sind.

Schließlich läßt sich eine Kombination aus jeder dieser Techniken verwenden. Zum Beispiel kann ein Paar besonders kurzer Glasblöcke auf die mit dem Endomikroskop 290 von Fig. 12 gezeigte Weise genutzt werden, wobei die Länge der Blöcke unter Berücksichtigung von Raumbedarf und Gewicht minimal gehalten wird, aber optische Monomodenfaser mit einem Kern mit großem Durchmesser für die erste und zweite optische Faser zum Einsatz kommen. Anschließend läßt sich der kombinierte Effekt dieser beiden

Abwandlungen nutzen, um die Spitzenleistung des Strahls in der ersten und zweiten optischen Faser auf einem akzeptablen Wert zu halten.

Vom Fachmann können Abwandlungen innerhalb des Grundgedankens und Schutzzumfangs der Erfindung leicht vorgenommen werden. Daher sollte verständlich sein, daß die Erfindung nicht auf die speziellen Ausführungsformen beschränkt ist, die zuvor beispielhaft beschrieben wurden.

Patentansprüche

1. Endoskop oder Mikroskop mit:
einer optischen Faser zum Übertragen eines gepulsten Hauptstrahls über mindestens einen Abschnitt eines optischen Wegs zwischen einer Strahlquelle und einem Gewebe oder einer anderen Probe; und
einer Dispergiereinrichtung;
wodurch in der optischen Faser auftretende Dispersion durch Dispersion umgekehrt wird, die in der Dispergiereinrichtung erzeugt wird.
2. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 1, wobei die Dispergiereinrichtung eine optisch nach der optischen Faser angeordnete Kompressionseinrichtung zum Komprimieren des Strahls aufweist, nachdem der Strahl die optische Faser verläßt, um die Spitzenleistung des Hauptstrahls innerhalb der optischen Faser zu reduzieren.
3. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 1 oder 2 mit einer optisch vor der optischen Faser angeordneten Dispersionseinrichtung zum Dispergieren des Hauptstrahls, bevor der Hauptstrahl in die optische Faser eintritt.
4. Endoskop oder Mikroskop nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die optische Faser einen Kern mit großem Durchmesser und damit eine niedrige V-number hat, um die Flächenleistungsdichte im Kern zu reduzieren.
5. Endoskop oder Mikroskop nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die optische Faser einen reinen Siliziumoxiddkern und einen fluoriddotierten Mantel hat, um nichtlineare optische Effekte innerhalb der Faser zu minimieren.
6. Endoskop oder Mikroskop nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Dispergiereinrichtung eine weitere optische Faser aufweist.
7. Verfahren zur Zweiphotonen-Endoskopie oder Mikroskopie mit den folgenden Schritten:
Übertragen eines gepulsten Hauptlaserstrahls längs einer optischen Faser über mindestens einen Abschnitt eines optischen Wegs zwischen einer Strahlquelle und einem Gewebe oder einer anderen Probe; und
Dispergieren des Strahls mittels einer Dispergiereinrichtung;
wodurch in der optischen Faser auftretende Dispersion durch Dispersion umgekehrt wird, die durch die Dispergiereinrichtung erzeugt wird.
8. Endoskop oder Mikroskop mit:
einer Strahlteilereinrichtung zum Teilen eines gepulsten Hauptlaserstrahls in einen ersten und zweiten Strahl;
einer ersten optischen Faser zum Übertragen des Hauptstrahls zur Strahlteilereinrichtung;
einer Antidispersionseinrichtung zum Reduzieren der Dispersion des ersten und zweiten Strahls;
einer optischen Kopplereinrichtung zum Rekombinieren mindestens eines Abschnitts des jeweiligen ersten und zweiten Strahls zu einem rekombinierten Strahl; und

einer zweiten optischen Faser zum Übertragen des rekombinierten Strahls von der optischen Kopplereinrichtung zu einem Endoskop- oder Mikroskopkopf;

wobei der Hauptstrahl durch die Strahlteilereinrichtung in den ersten und zweiten Strahl geteilt werden kann, deren Dispersion anschließend durch die Antidispersionseinrichtung reduziert werden kann und die dann durch die optische Kopplereinrichtung rekombiniert werden können, um einen rekombinierten Zweiphotonenstrahl zur Übertragung längs der zweiten optischen Faser zum Kopf zu bilden.

9. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 8, wobei das Endoskop oder Mikroskop eine Laserquelle aufweist, um den Hauptstrahl bereitzustellen.

10. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 9, wobei die Laserquelle ein Ultrakurzimpuls-Laser ist.

11. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei die erste optische Faser eine Monomodenfaser bei der Wellenlänge des Hauptstrahls ist.

12. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei die Strahlteilereinrichtung und/oder die optische Kopplereinrichtung jeweils ein optischer Koppler ist.

13. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei die Strahlteilereinrichtung und die optische Kopplereinrichtung durch einen einzelnen optischen Koppler gebildet sind.

14. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 13, wobei die Strahlteilereinrichtung den Hauptstrahl etwa gleichmäßig in den ersten und zweiten Strahl teilt.

15. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 14, wobei die Antidispersionseinrichtung eine Umkehrchirp-Bragg-Gitterfaser mit enger beabstandeten Gittern aufweist, die optisch näher an der Strahlteilereinrichtung angeordnet sind.

16. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 14, wobei die Antidispersionseinrichtung eine erste und zweite Umkehrchirp-Bragg-Gitterfaser aufweist, eine zum Empfangen des jeweiligen ersten und zweiten Strahls, jeweils mit enger beabstandeten Gittern, die optisch näher an der Strahlteilereinrichtung angeordnet sind.

17. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 16, wobei das Endoskop oder Mikroskop ferner eine optische Faser mit großem Durchmesser und einen Mantelmodenkoppler aufweist, wobei der Mantelmodenkoppler die zweite optische Faser und die Faser mit großem Durchmesser so koppelt, daß Weitwinkel-Streulicht vom Kopf durch den Koppler im wesentlichen in die Faser mit großem Durchmesser zur Übertragung zu einem Photodetektor eingekoppelt wird.

18. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 17, wobei das Endoskop oder Mikroskop eine optisch nach der zweiten optischen Faser angeordnete Kompressionseinrichtung zum Komprimieren des rekombinierten Strahls aufweist, nachdem der rekombinierte Strahl die zweite optische Faser verläßt, wodurch die Spitzenleistung des Hauptstrahls innerhalb der ersten optischen Faser und des rekombinierten Strahls in der zweiten optischen Faser reduziert ist.

19. Endoskop oder Mikroskop mit:
einer Dispergiereinrichtung zum zeitweiligen spektroskopischen Dispergieren eines gepulsten Hauptlaserstrahls;
und

einer optischen Faser zum Übertragen des dispergierten Hauptstrahls zu einem Endoskop- oder Mikroskopkopf und Reduzieren der Dispersion durch Komprimieren des dispergierten Hauptstrahls.

20. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 19, wobei die optische Faser die durch die Dispergiereinrichtung eingeführte Dispersion im wesentlichen umkehrt.

21. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 19, wobei das Endoskop oder Mikroskop einen Kopf hat und der Kopf eine optisch nach der optischen Faser angeordnete Kompressionseinrichtung zum Fördern oder Abschließen der Kompression des dispergierten Hauptstrahls aufweist, um die Spitzenleistung des Hauptstrahls innerhalb der optischen Faser zu reduzieren.

22. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei die Dispergiereinrichtung auch eine Strahlteileranordnung zum Auswählen des durch ein Gewebe oder eine andere Probe emittierten Fluoreszenzlichts ist.

23. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei die Dispergiereinrichtung ein Paar Beugungs- oder Brechungselemente aufweist.

24. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei die Dispergiereinrichtung ein Paar Blaze-Gitter und ein Prisma aufweist.

25. Endoskop oder Mikroskop mit einem Kopf, wobei das Endoskop oder Mikroskop aufweist: eine Saug- oder Unterdruckquelle, die nahe dem Kopf angeordnet ist;

eine Lichtauffangeinrichtung zum Auffangen von Licht von einer Probe; und

eine Probenaufnahmeeinrichtung, die mit der Saugquelle gekoppelt ist, zum Aufnehmen der Probe, wenn die Probe durch die Saugquelle daran gedrückt wird; wobei die Saugquelle verwendet wird, um die Probe zur Aufnahmeeinrichtung zu drücken, wodurch die Probe so verformt wird, daß die Lichtauffangeinrichtung einen Teil des durch die Probe vom Kopf weg emittierten Lichts auffangen kann.

26. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 25, wobei die Probenaufnahmeeinrichtung napfförmig oder kegelförmig ist.

27. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 25 oder 26, wobei die Lichtauffangeinrichtung im Gebrauch durch die Probenaufnahmeeinrichtung von der Probe getrennt ist und die Probenaufnahmeeinrichtung für das Licht zwischen der Probe und der Lichtauffangeinrichtung im wesentlichen durchlässig ist.

28. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 25 bis 27, wobei die Lichtauffangeinrichtung eine optische Faser aufweist.

29. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 25 bis 28, wobei die Lichtauffangeinrichtung einen Spiegel aufweist.

30. Endoskop oder Mikroskop nach Anspruch 29 mit einer Linse zum Fokussieren von Licht vom Spiegel.

31. Endoskop oder Mikroskop nach einem der Ansprüche 25 bis 30, wobei die Lichtauffangeinrichtung eine von mehreren Lichtauffangeinrichtungen ist.

32. Verfahren zur Zweiphotonen-Endoskopie oder Mikroskopie mit den folgenden Schritten:

1) Übertragen eines gepulsten Hauptlaserstrahls längs einer optischen Faser;

2) Teilen des Hauptstrahls in einen ersten und zweiten Strahl;

3) Komprimieren des ersten und zweiten Strahls;

4) Kombinieren mindestens eines Abschnitts des

ersten und zweiten Strahls;

5) Übertragen des ersten und zweiten Strahls längs einer optischen Faser zu einem Endoskop- oder Mikroskopkopf.

33. Endoskop- oder Mikroskopsystem mit:

einem Endoskop oder Mikroskop mit einem Photodetektor;

einer Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung von Umgebungsbeleuchtung;

einer Schalteinrichtung zum Ein- und Ausschalten der Beleuchtungseinrichtung; und

einer Synchronisationseinrichtung zum Synchronisieren der Schalteinrichtung mit Erfassungsperioden des Endoskops oder Mikroskops;

wobei die Synchronisationseinrichtung so betreibbar ist, daß sie die Schalteinrichtung steuert, um die Beleuchtungseinrichtung während der Erfassungsperioden aus- und zwischen aufeinanderfolgenden Erfassungsperioden einzuschalten.

34. Endoskop- oder Mikroskopsystem nach Anspruch 33, wobei die Synchronisationseinrichtung so betreibbar ist, daß sie die Schalteinrichtung steuert, um die Beleuchtungseinrichtung so zu schalten, daß die Beleuchtungseinrichtung während der Rücklaufperiode des Endoskops oder des Mikroskops eingeschaltet ist.

35. Endoskop- oder Mikroskopsystem nach Anspruch 33 oder 34, wobei der Photodetektor so betreibbar ist, daß er ausgeschaltet ist, wenn die Beleuchtungseinrichtung eingeschaltet ist.

36. Endoskop- oder Mikroskopsystem nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei der Photodetektor eine Stromversorgung hat, die so betreibbar ist, daß sie ausgeschaltet ist, wenn die Beleuchtungseinrichtung eingeschaltet ist.

37. Endoskop- oder Mikroskopsystem mit:

einem Endoskop oder Mikroskop mit einem Photodetektor;

einer Beleuchtungseinrichtung zur Bereitstellung von Umgebungsbeleuchtung; und

einer Filtereinrichtung zum Reduzieren der Detektion der Umgebungsbeleuchtung durch den Photodetektor.

38. Endoskop- oder Mikroskopsystem nach Anspruch 37, wobei die Beleuchtungseinrichtung Licht emittiert, das durch die Filtereinrichtung bevorzugt blockiert wird.

39. Endoskop- oder Mikroskopsystem nach Anspruch 37, wobei die Filtereinrichtung eine erste Filtereinrichtung ist und das System aufweist: eine zweite Filtereinrichtung zum Absorbieren von Licht von der Beleuchtungseinrichtung, das durch die erste Filtereinrichtung bevorzugt durchgelassen wird, und Übertragen von Licht von der Beleuchtungseinrichtung, das durch die Filtereinrichtung bevorzugt blockiert wird.

40. Endoskop- oder Mikroskopsystem nach einem der Ansprüche 37 bis 39 mit einer Schalteinrichtung zum Ein- und Ausschalten der Beleuchtungseinrichtung und einer Synchronisationseinrichtung zum Synchronisieren der Schalteinrichtung mit Erfassungsperioden des Endoskops oder Mikroskops, wobei die Synchronisationseinrichtung so betreibbar ist, daß sie die Schalteinrichtung steuert, um die Beleuchtungseinrichtung während der Erfassungsperioden aus- und zwischen aufeinanderfolgenden Erfassungsperioden einzuschalten.

41. Endoskop- oder Mikroskopsystem nach einem der Ansprüche 37 bis 40 mit einer Verschlusseinrichtung zum Abdecken des Photodetektors, wobei die Synchronisationseinrichtung so betreibbar ist, daß sie die Verschlusseinrichtung steuert, um den Photodetektor abzu-

decken, wenn die Beleuchtungseinrichtung eingeschaltet ist, und den Photodetektor während der Erfassungsperioden freizulegen.

Hierzu 14 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

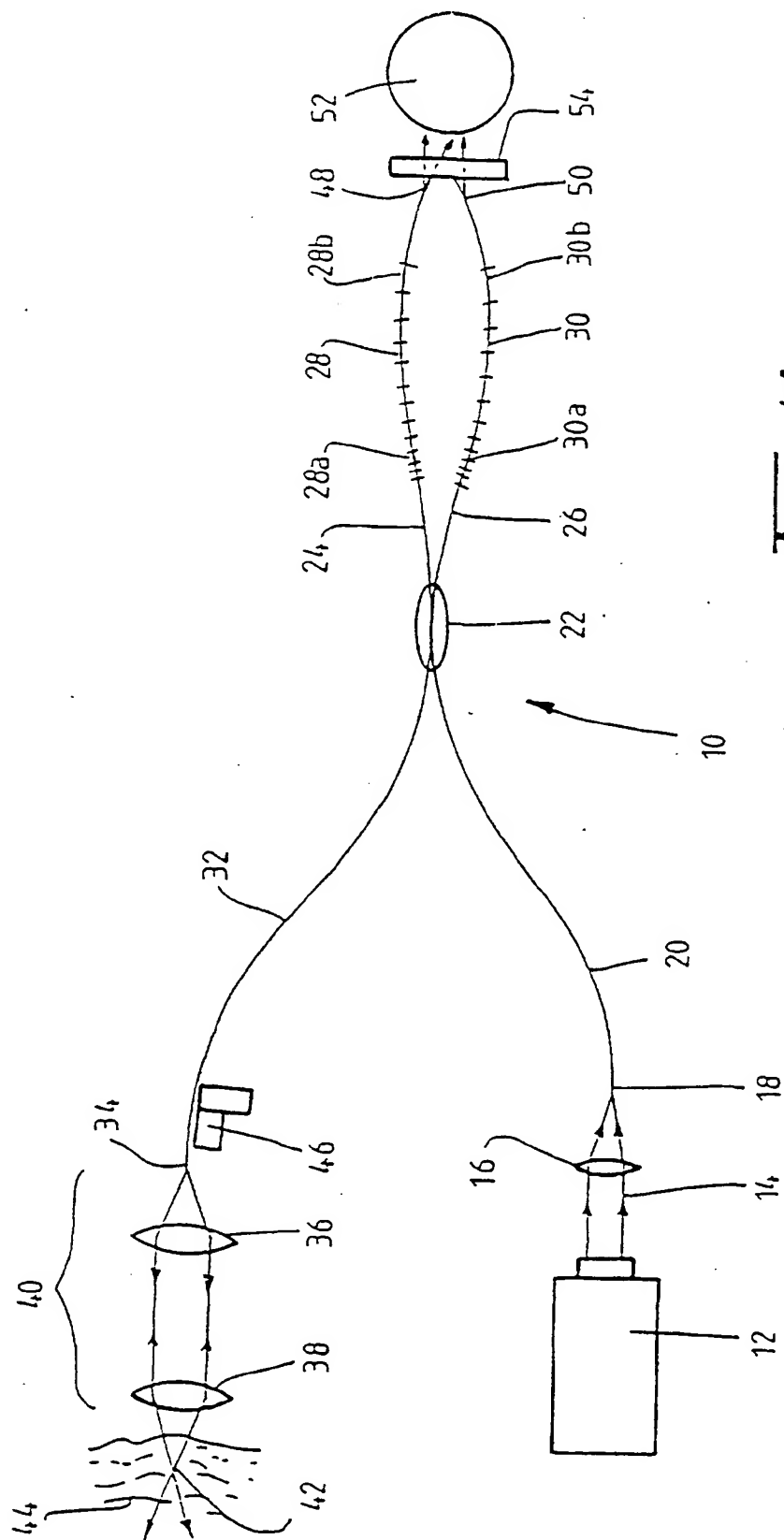


FIG. 1A.

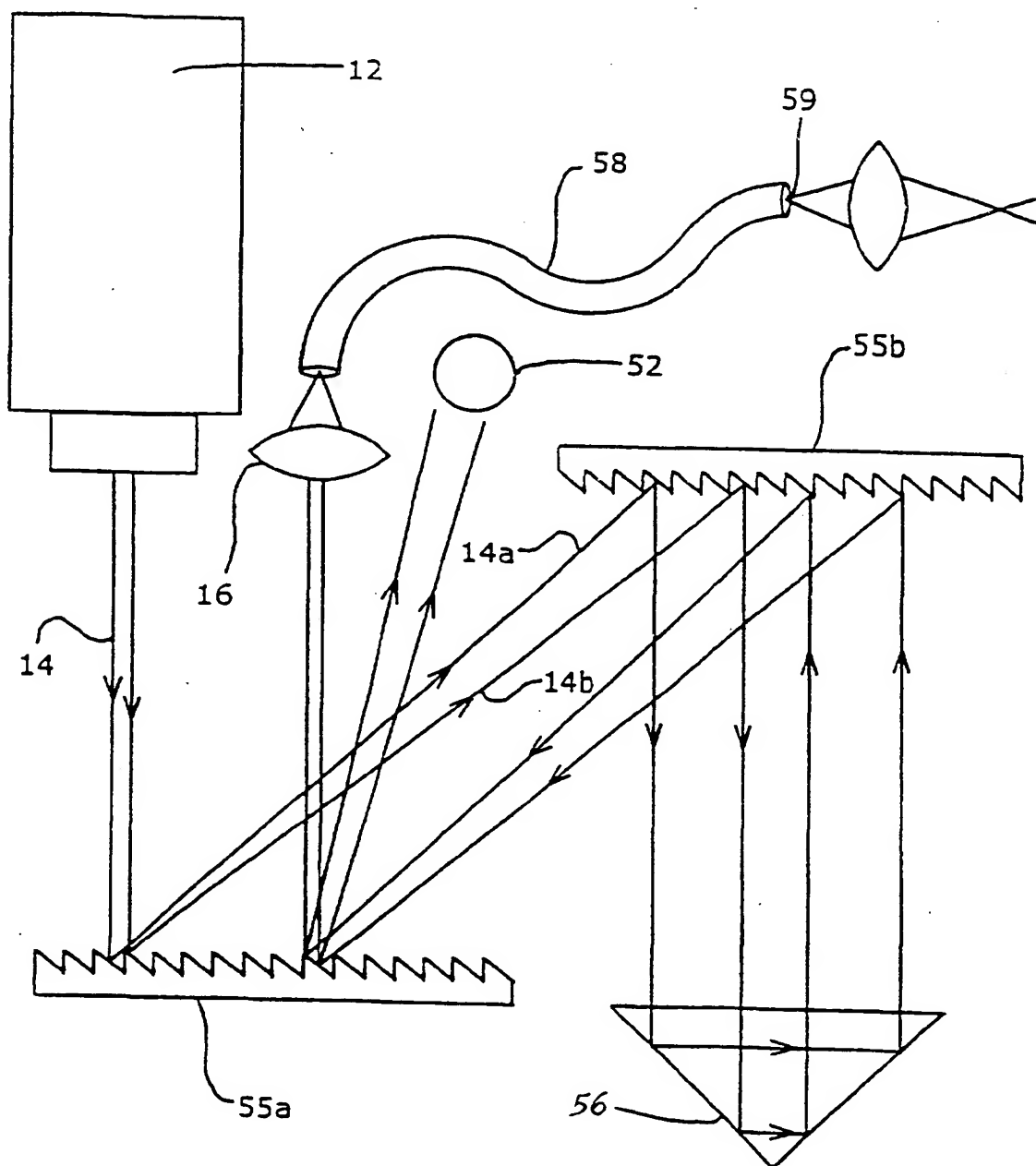
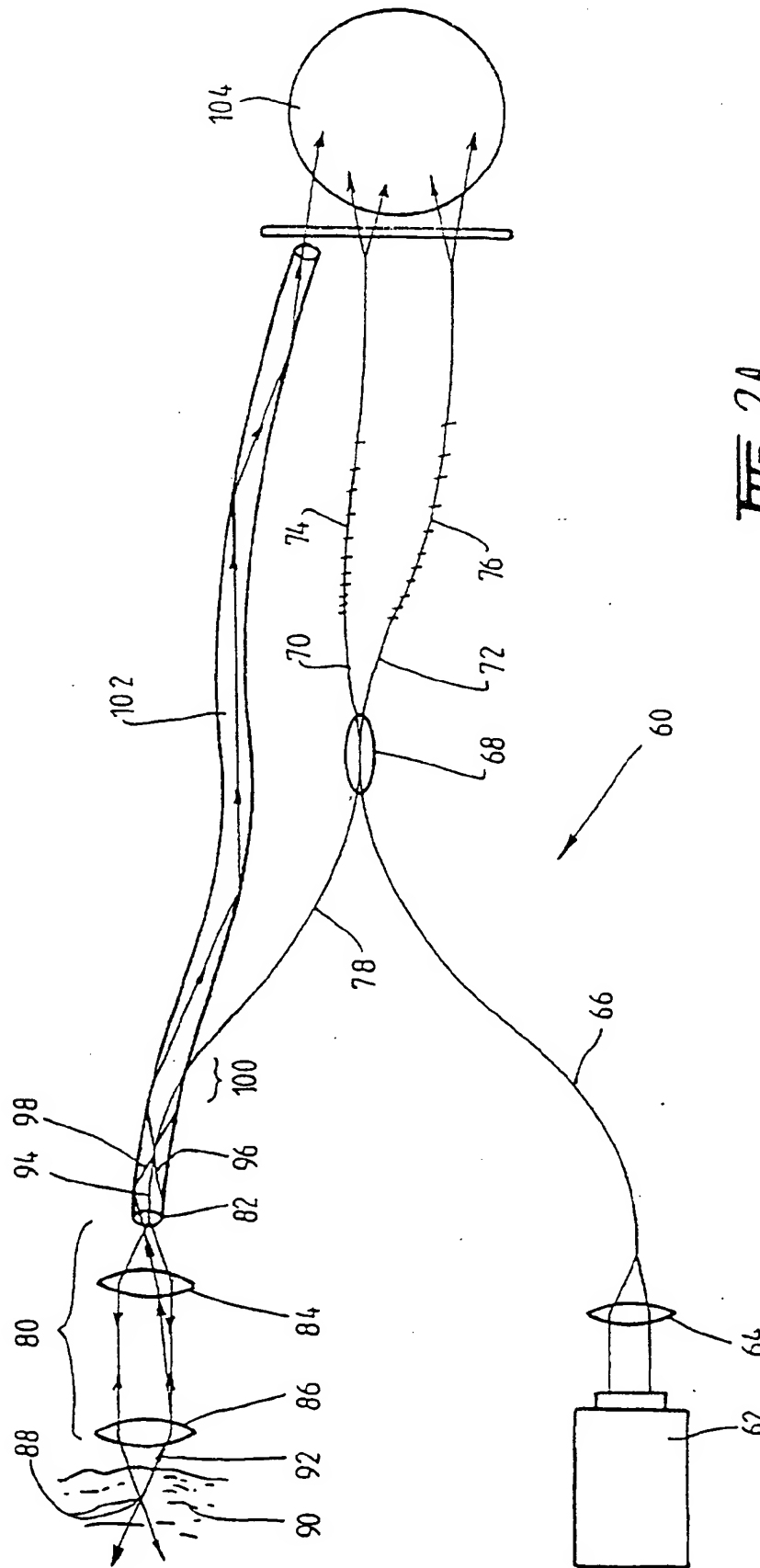


FIG. 1B



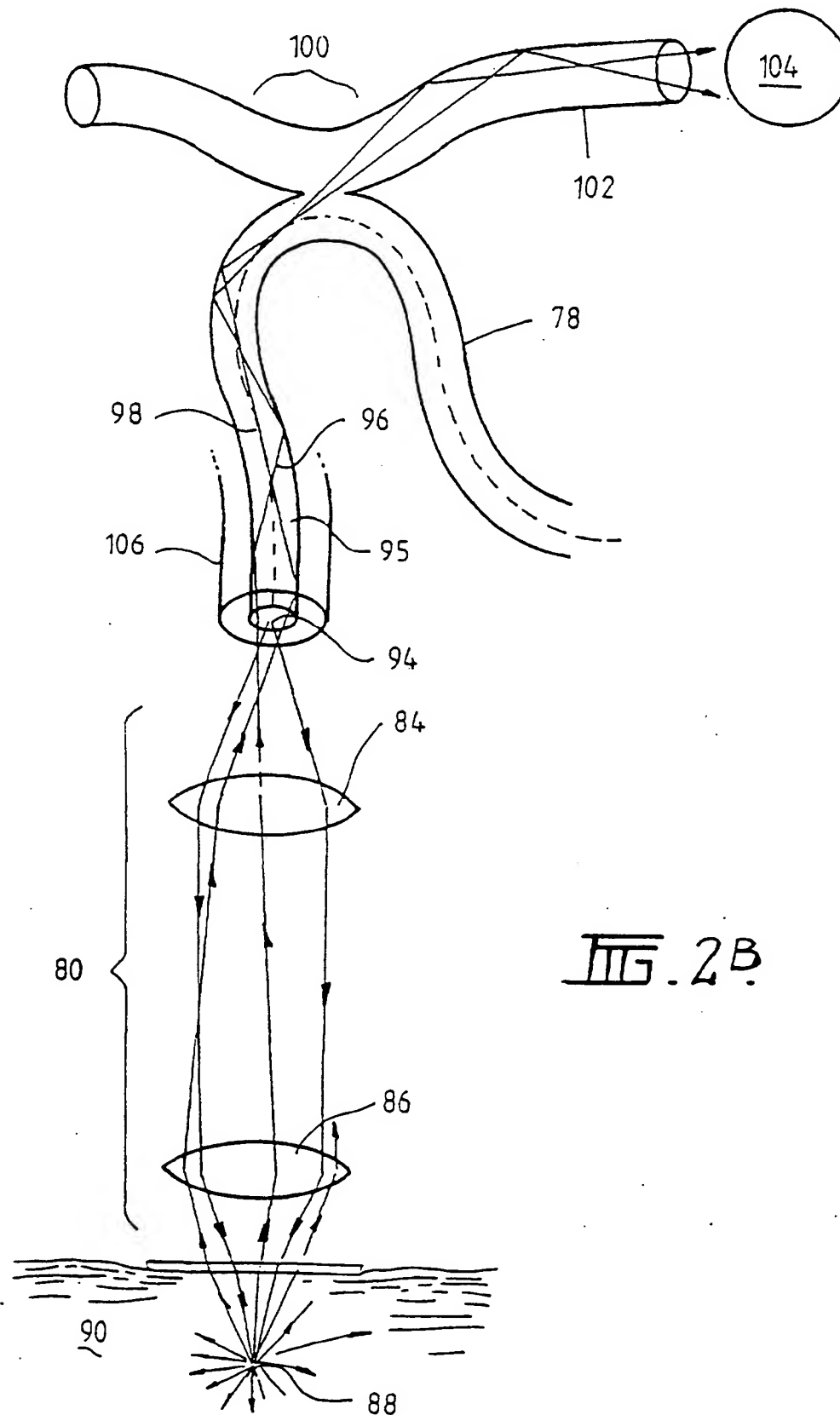


Fig. 2B

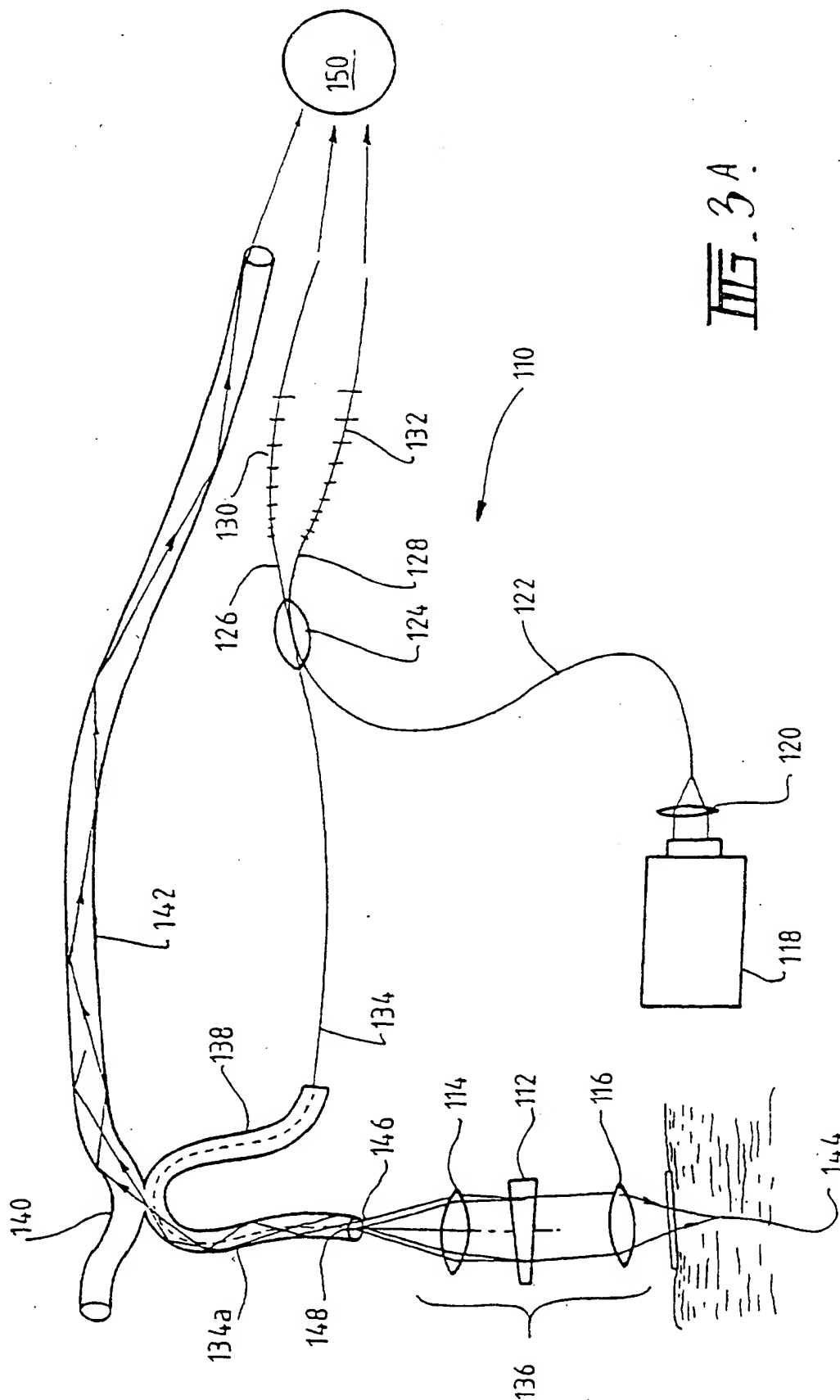
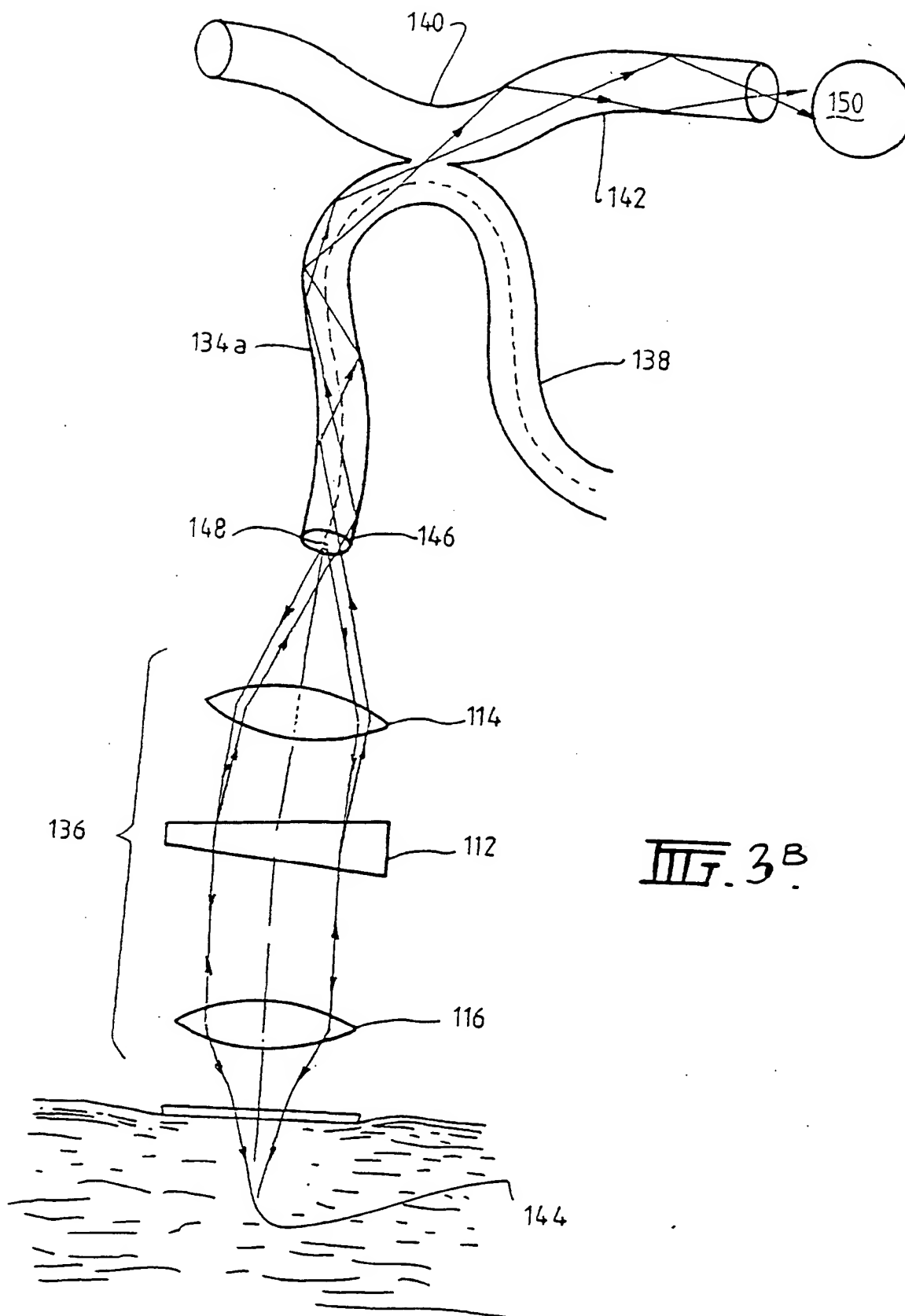


Fig. 3A



III. 3^B

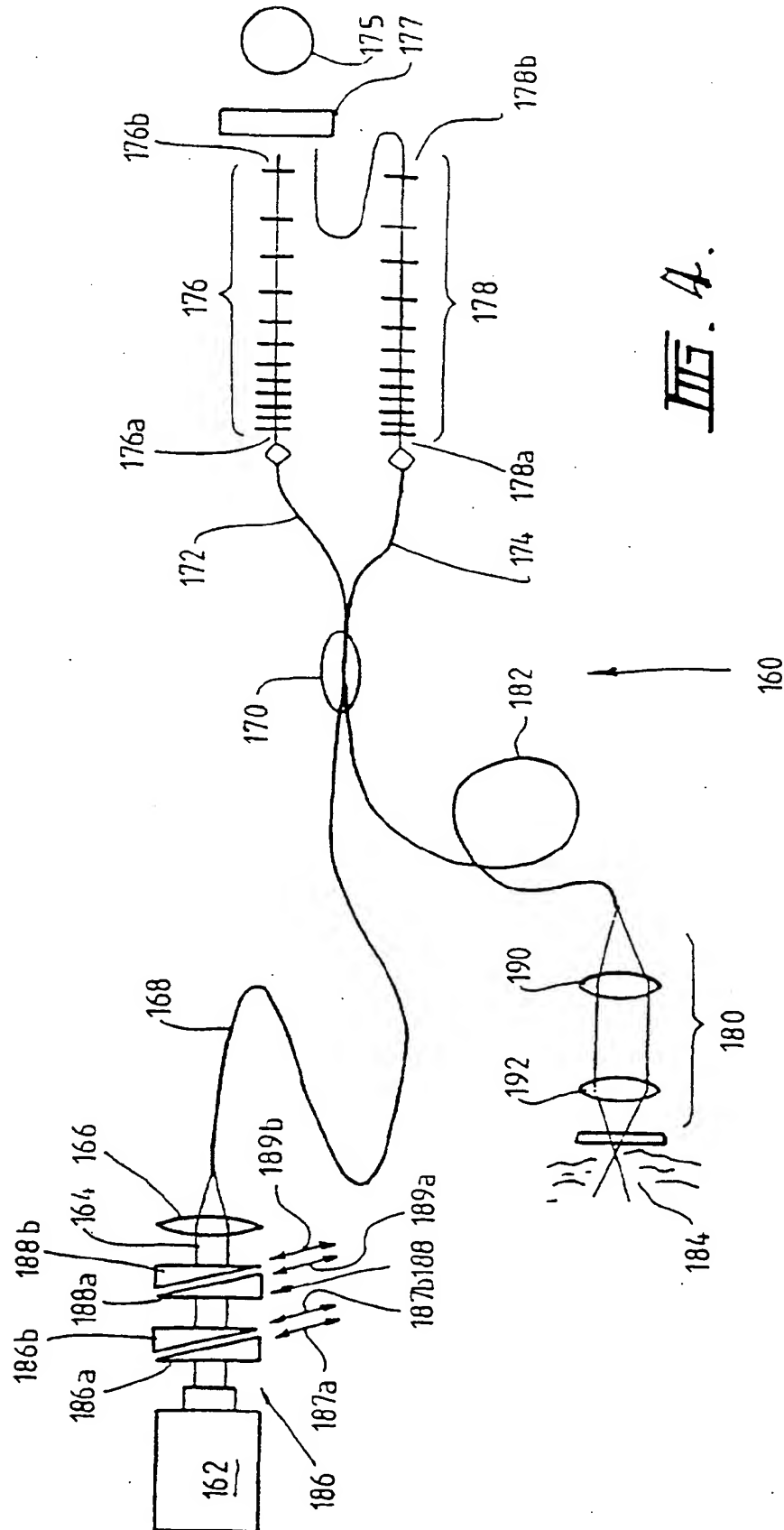
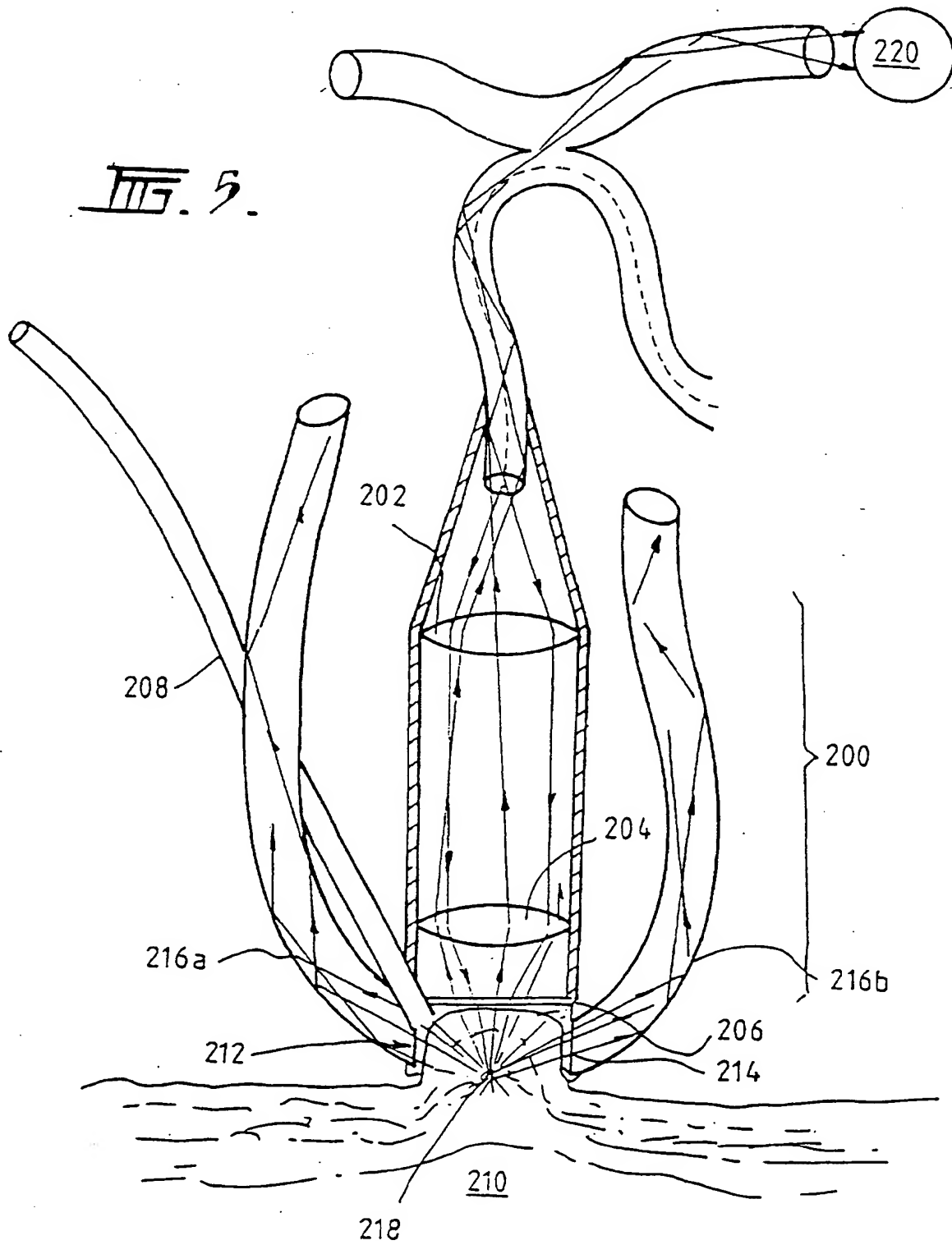
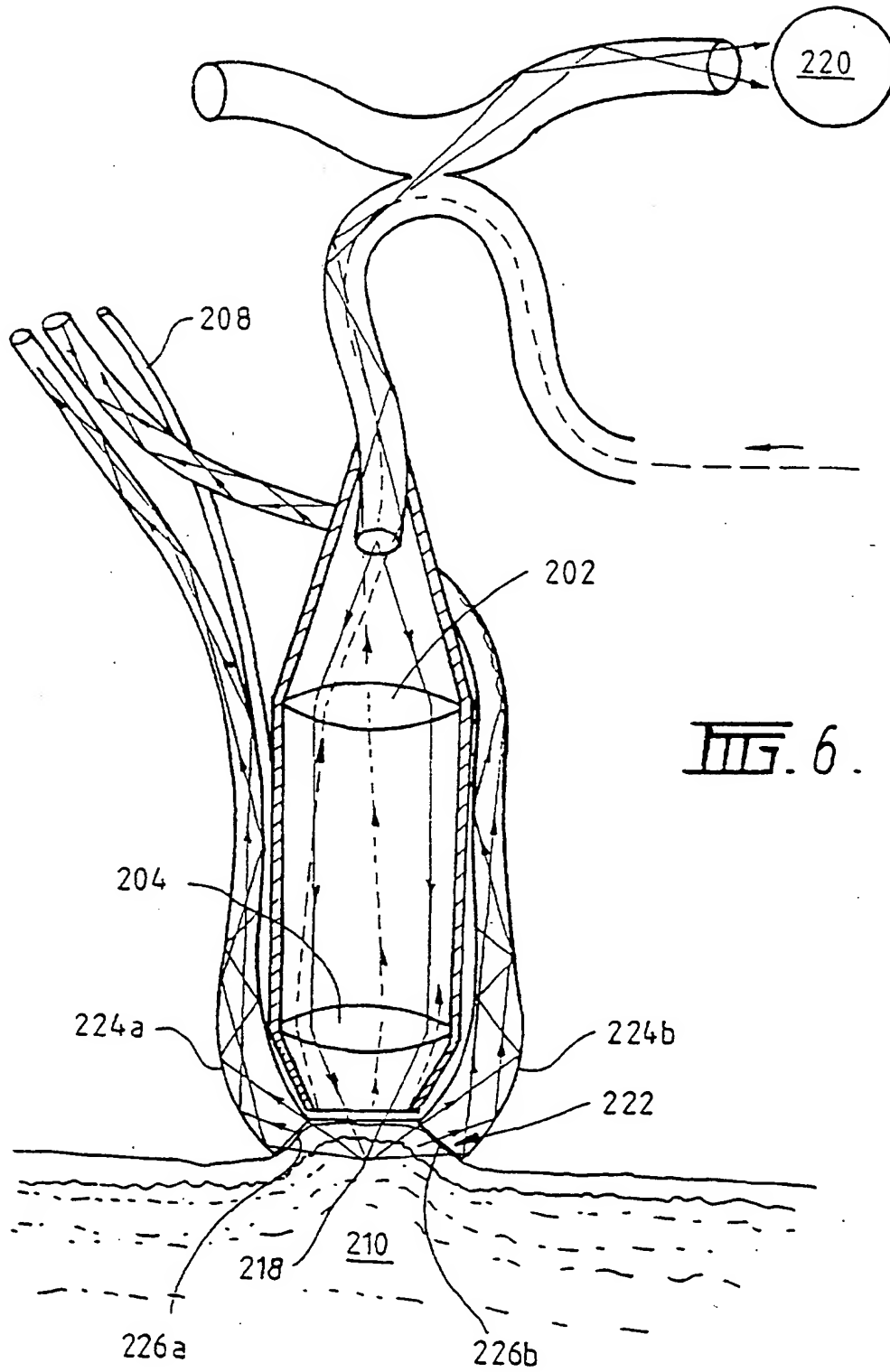


Fig. 4.

Fig. 5.





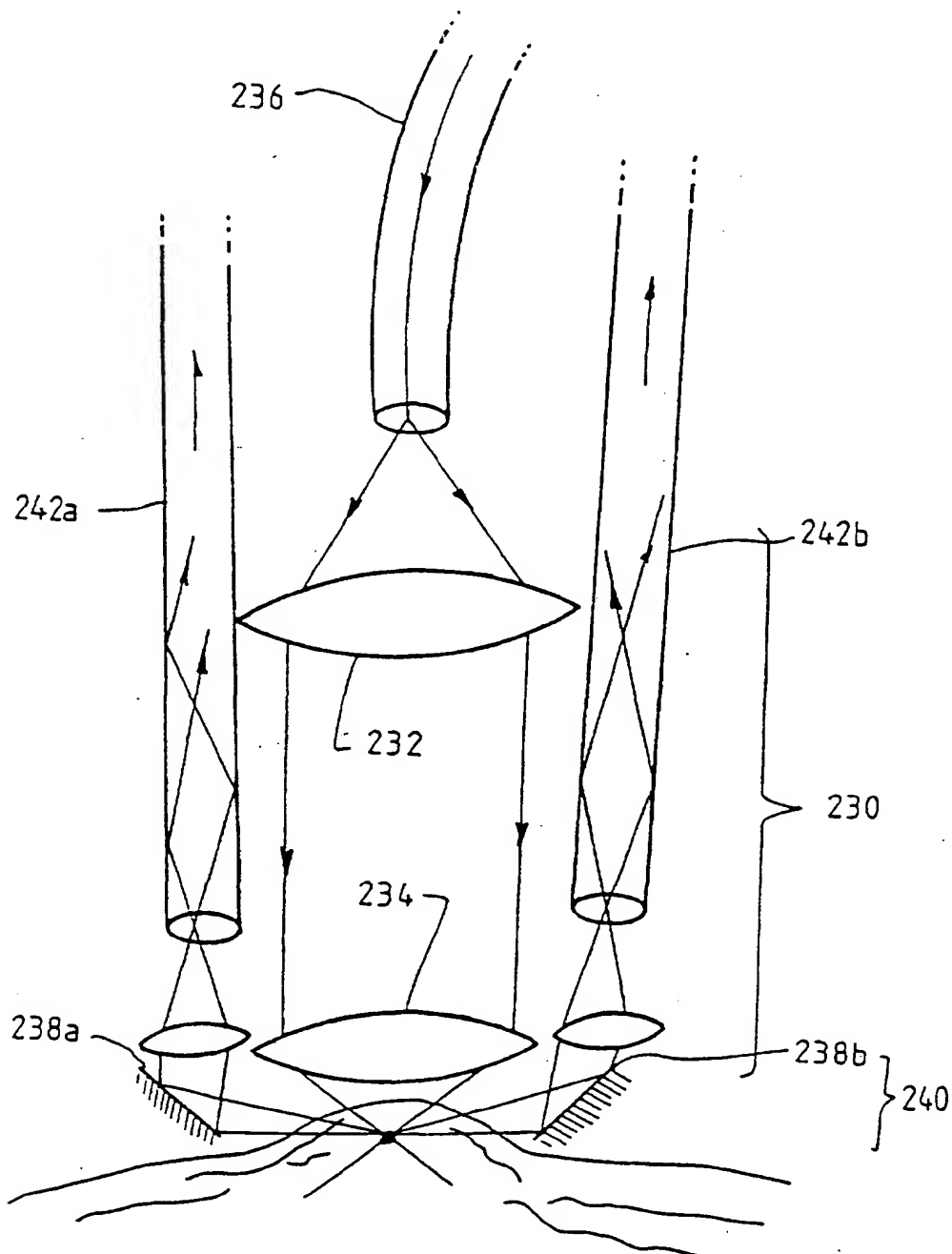


Fig. 7.

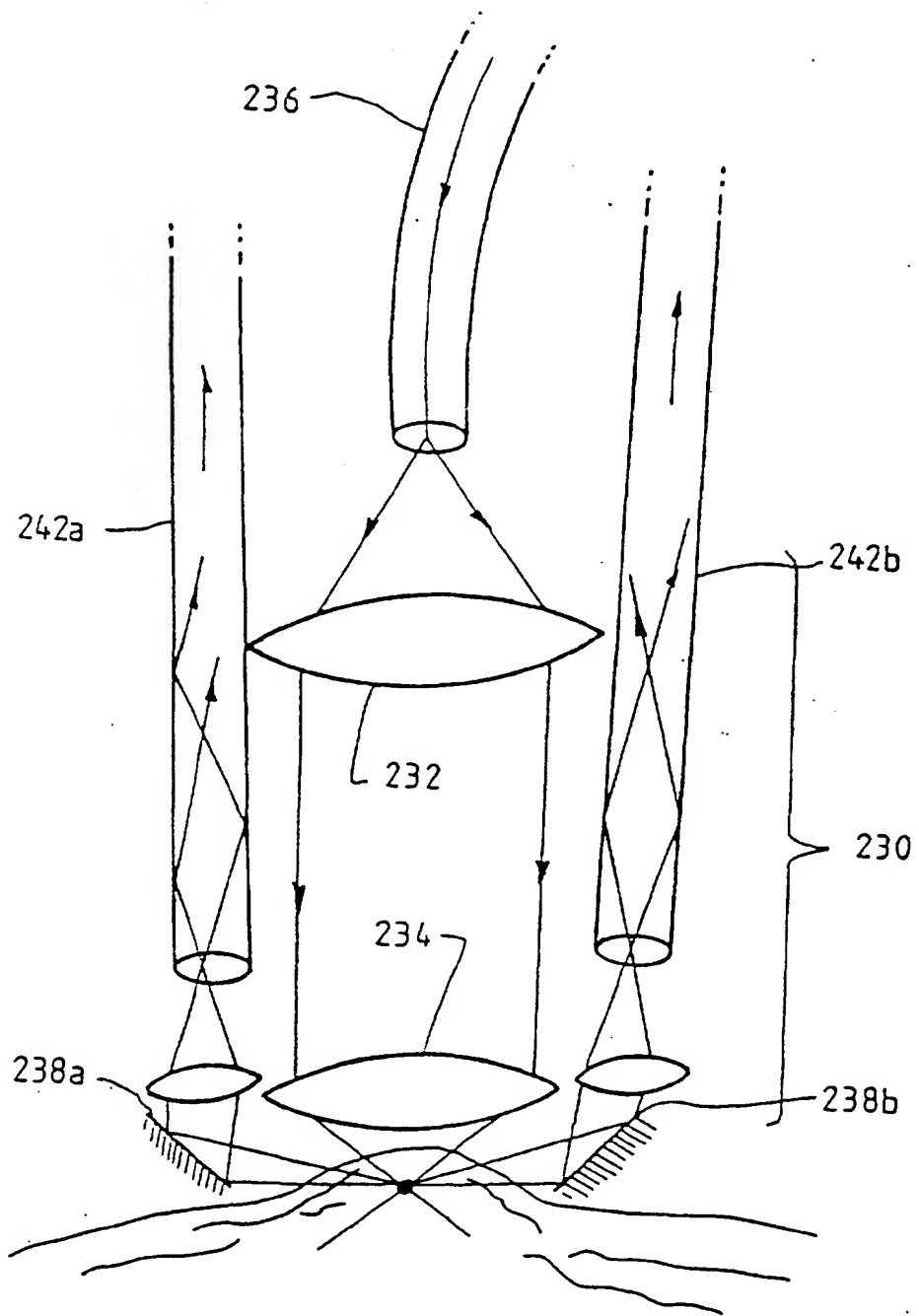


Fig. 8.

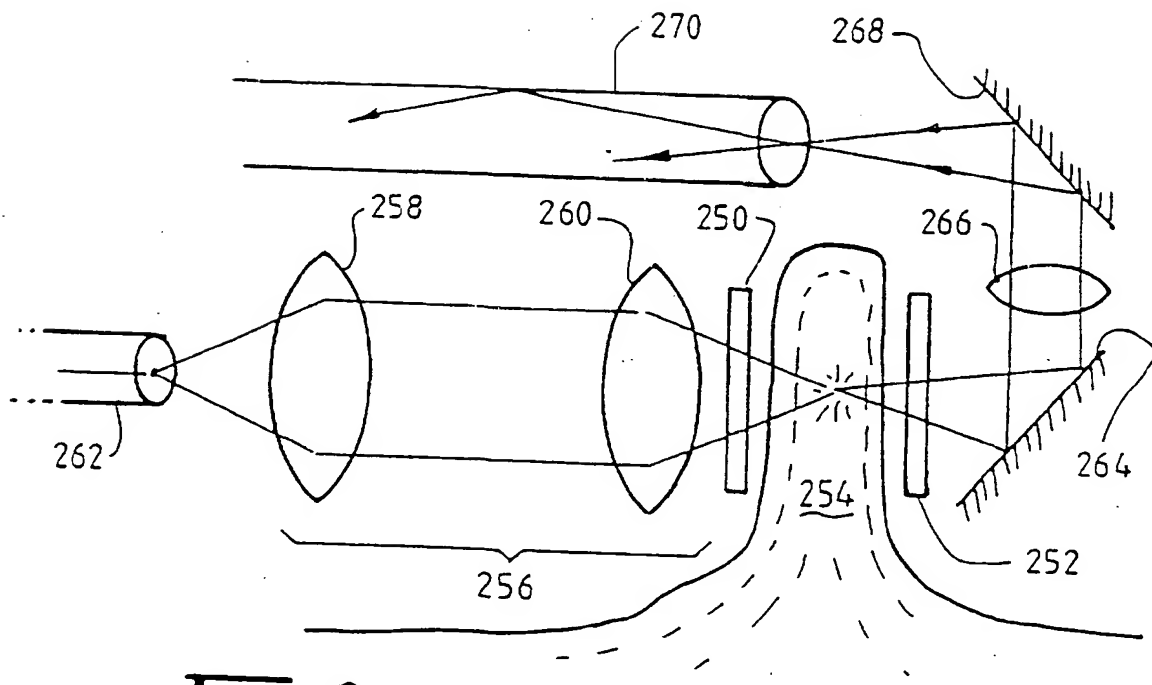


FIG. 9.

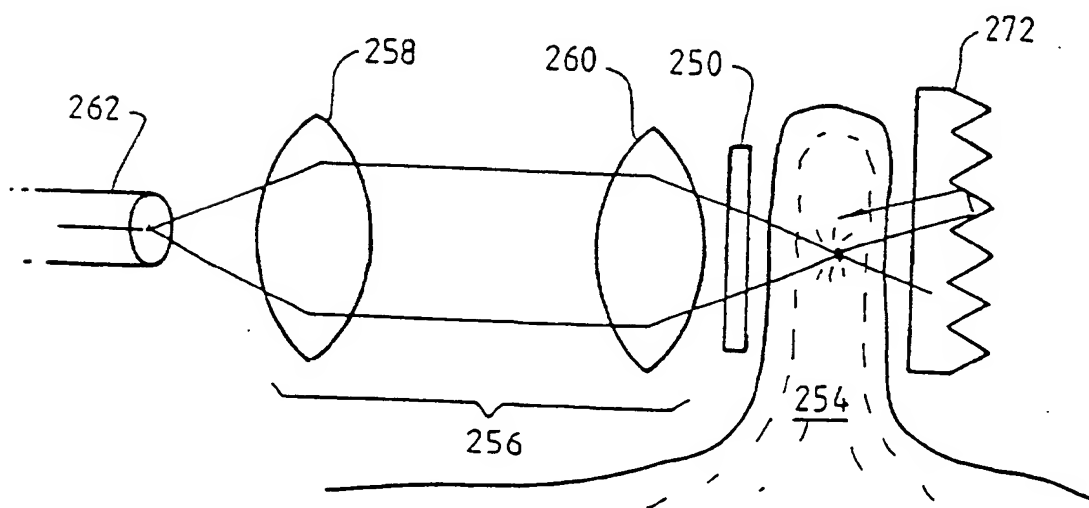
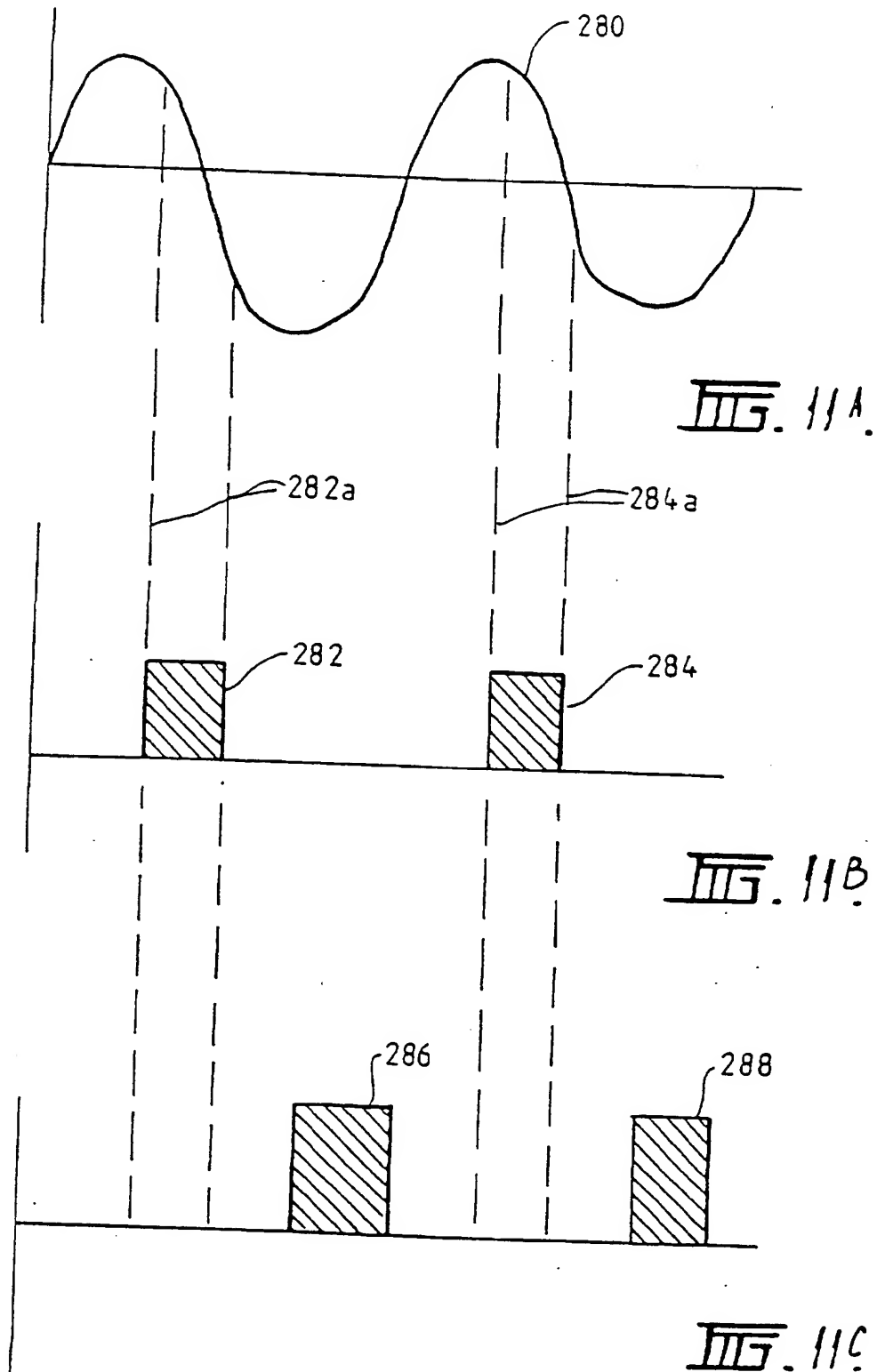


FIG. 10.



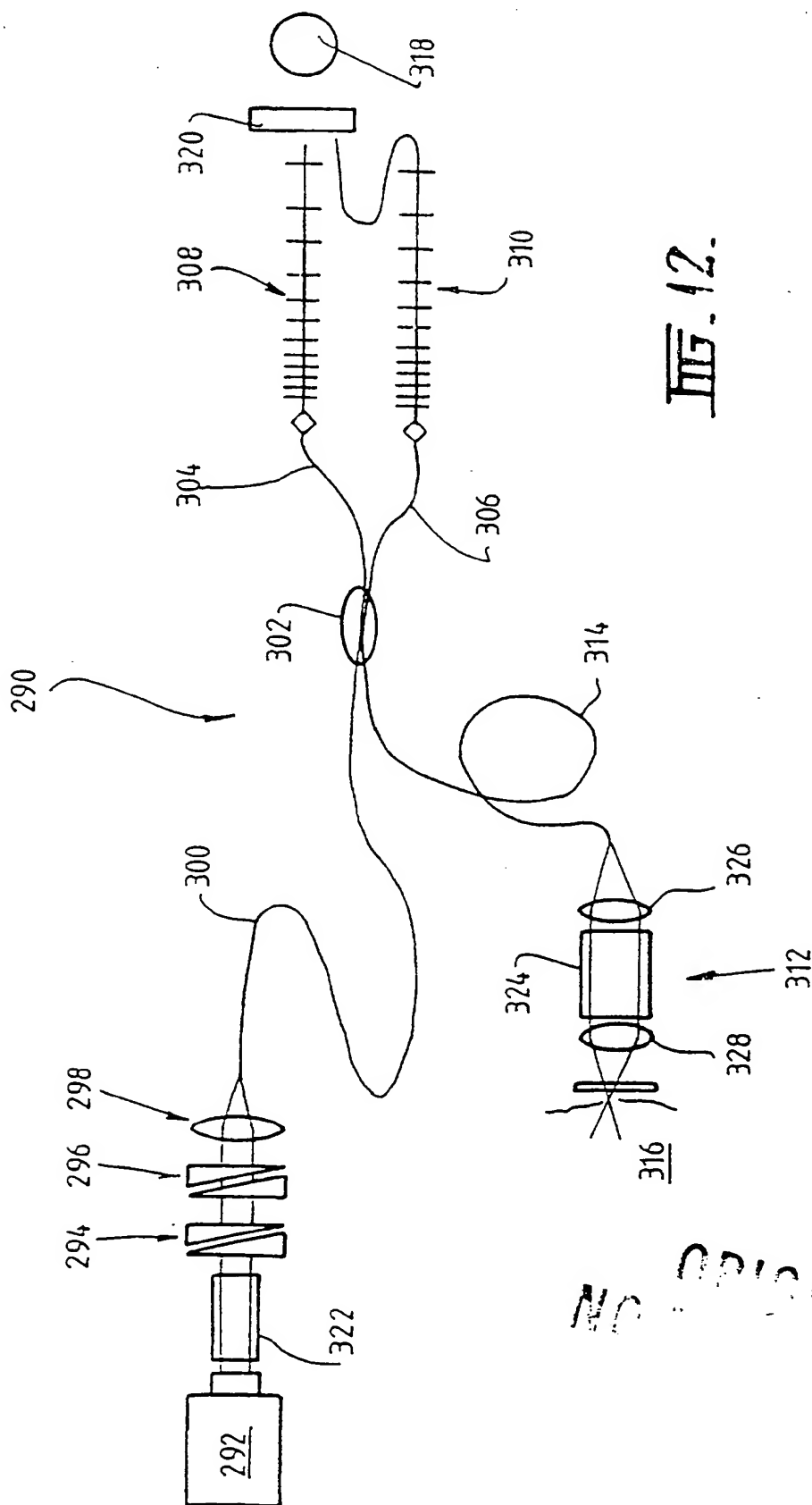


Fig. 12.

NO ORIGINAL